

Università degli Studi di Napoli “Federico II”

Facoltà di Medicina Veterinaria



Dottorato Di Ricerca

In

Organismi modello nella ricerca biomedica e veterinaria

XXV Ciclo

**Effetti dei biocidi rilasciati dalle vernici antivegetative (Tributil stagno
e Diuron) sui meccanismi riproduttivi dell'invertebrato marino *Ciona*
*Intestinalis***

Relatore

Dott.ssa Elisabetta Tosti

Dottoranda

Dott.ssa Alessandra Gallo

Coordinatore

Prof. Paolo de Girolamo

INDICE

ABSTRACT	Pag. 3
1. INTRODUZIONE	
1.1 La Riproduzione.....	Pag. 5
1.2 Proprietà elettriche degli ovociti.....	Pag. 5
1.3 Riproduzione e Ambiente Marino.....	Pag. 9
1.4 <i>Biofouling</i>	Pag. 9
1.5 Sistemi <i>Antifouling</i> : Le vernici antivegetative.....	Pag. 12
1.6 TBT: Struttura e Proprietà.....	Pag. 13
1.6.1 Storia e Applicazioni.....	Pag. 14
1.6.2 Presenza e speciazione in ambiente marino.....	Pag. 16
1.6.3 Rilevanza ambientale.....	Pag. 18
1.6.4 Legislazione.....	Pag. 20
1.7 Biocidi organici di nuova generazione.	Pag. 21
1.8 Diuron: Struttura e Proprietà.	Pag. 22
1.8.1 Storia e Applicazioni.....	Pag. 23
1.8.2 Presenza e speciazione in ambiente marino.....	Pag. 23
1.8.3 Rilevanza ambientale.....	Pag. 25
1.8.4 Legislazione.....	Pag. 26
1.9 Saggi ecotossicologici.....	Pag. 27
1.10 Le ascidie.....	Pag. 28
1.10.1 Ciclo riproduttivo dell'ascidia <i>Ciona intestinalis</i>	Pag. 31
1.10.2 Proprietà elettriche degli ovociti di ascidie	Pag. 34
2. SCOPO DELLA RICERCA.....	Pag. 37
3. MATERIALI E METODI	
3.1 Sistema modello.....	Pag. 38
3.2 Animali e gameti.....	Pag. 39

3.3	Preparazioni delle soluzioni.....	Pag. 39
3.4	<i>Whole-cell voltage clamp</i>	Pag. 40
3.4.1	Il <i>set up</i> di elettrofisiologia.....	Pag. 40
3.4.2	La tecnica del whole-cell voltage clamp.....	Pag. 42
3.5	Test di tossicità.....	Pag. 47
3.5.1	Test di spermiotossicità.....	Pag. 47
3.5.2	Test di tossicità sugli ovociti.....	Pag. 48
3.5.3	Test di embriotossicità.....	Pag. 48
3.5.4	Valutazione della percentuale di fecondazione e di larve normomorfe.....	Pag. 48
3.6	Analisi statistica.....	Pag. 49
4.	RISULTATI	
4.1	Influenza del TBT e del diuron sulla conduttanza della membrana plasmatica.....	Pag. 50
4.2	Influenza del TBT e del diuron sulle correnti di sodio.....	Pag. 52
4.3	Influenza del TBT e del diuron sulle costanti di tempo dei canali di sodio voltaggio-dipendenti.....	Pag. 58
4.4	Influenza del TBT e del diuron sulla corrente di fecondazione.....	Pag. 62
4.5	Test di tossicità	Pag. 67
4.5.1	Test di spermiotossicità.....	Pag. 67
4.5.2	Test di tossicità sugli ovociti.....	Pag. 70
4.5.3	Test di embriotossicità.....	Pag. 73
5.	DISCUSSIONE	Pag. 77
6.	CONCLUSIONI	Pag. 85
7.	BIBLIOGRAFIA	Pag. 87

ABSTRACT

La riproduzione è il processo biologico con cui un organismo vivente dà origine ad uno o più discendenti garantendo la conservazione della specie. Negli organismi marini a fecondazione esterna gli spermatozoi, gli ovociti e gli embrioni possono essere esposti ad inquinanti ambientali provenienti da attività antropiche che ne possono alterare le funzioni fisiologiche con conseguente riduzione del successo riproduttivo.

La membrana plasmatica delle cellule è caratterizzata da proprietà elettriche passive quali capacità e conduttanza e attive quali le correnti ioniche, ossia flussi di ioni che attraversano i canali ionici, presenti nella membrana. Gli ovociti sono cellule elettrogeniche ossia capaci di cambiare le proprietà elettriche della membrana plasmatica in risposta a stimoli di vario genere.

In questo lavoro di tesi, abbiamo valutato e comparato l'influenza di due biocidi, tributyl stagno e diuron, sui meccanismi riproduttivi dell'invertebrato marino *Ciona intestinalis*.

Il tributyl stagno e il diuron sono composti, di vecchia e nuova generazione, rilasciati nell'ambiente marino dalle vernici antivegetative utilizzate per far fronte al fenomeno del *biofouling* che consiste nell'adesione di diversi tipi di organismi su superfici immerse in acqua di mare.

L'ascidia *Ciona intestinalis* è stata scelta come organismo modello in quanto la sua fisiologia riproduttiva è ben nota e in particolare gli assetti elettrici dei gameti e degli embrioni sono stati ampiamente studiati.

Con la tecnica elettrofisiologica del *whole cell voltage clamp* abbiamo valutato l'influenza dei due biocidi scelti sulle proprietà elettriche dell'ovocita maturo dell'ascidia *Ciona intestinalis* quali la conduttanza e correnti ioniche di membrana, e sugli eventi elettrici della fecondazione quali la corrente di fecondazione. Con differenti

saggi di tossicità abbiamo valutato l'effetto dei due biocidi antivegetativi sui gameti e sullo sviluppo embrionale.

I risultati ottenuti dimostrano che sia il tributil stagno che il diuron influenzano le proprietà elettriche della membrana plasmatica, ne aumentano la conduttanza e riducono in modo dose dipendente le correnti di sodio che caratterizzano gli ovociti maturi di questa ascidia. Il tributil stagno ma non il diuron influenza inoltre la frequenza e l'ampiezza della corrente di fecondazione.

Il pre-trattamento con tributil stagno e con diuron di ovociti e spermatozoi non influisce sulla fecondazione e sullo sviluppo embrionale. Tuttavia ovociti fecondati in acqua di mare contenente tributil stagno, ma non diuron, si fecondano in minor percentuale e non si sviluppano in maniera normale.

Da questo lavoro emerge che: i) i due biocidi testati influenzano in maniera diversa sia le proprietà elettriche di membrana sia i processi riproduttivi rappresentando un fattore di rischio per la sopravvivenza di questa specie; ii) l'ascidia *Ciona intestinalis* può essere considerata un buon organismo modello da utilizzare per testare la tossicità degli xenobiotici; iii) la riproduzione può essere considerata un buon *biomarker*, indicatore del livello di rischio tossicologico a cui una determinata popolazione naturale può essere sottoposta.

1. INTRODUZIONE

1.1 *La riproduzione*

La riproduzione è il processo biologico con cui un organismo vivente dà origine ad uno o più discendenti garantendo la conservazione della specie. Si possono distinguere due tipi di riproduzione: asessuata e sessuata. Quest'ultima è la forma più diffusa ed è caratterizzata da due eventi: la meiosi e la fecondazione. La meiosi è il processo di divisione cellulare mediante il quale una cellula germinale progenitore con corredo cromosomico diploide dà origine a quattro cellule figlie, dette gameti, con corredo cromosomico aploide. Con la fecondazione i gameti, gli spermatozoi maschili e gli ovociti femminili, si fondono dando origine allo zigote, la prima cellula di un organismo vivente che andrà incontro a ripetute divisioni mitotiche per costituire l'organismo completo. Alla luce delle attuali conoscenze scientifiche [1-3] risulta evidente che la fecondazione è un processo altamente specializzato di interazione fra cellule che implica una serie di eventi a catena. In particolare, nell'interazione con lo spermatozoo l'ovocita va incontro ad una serie di modifiche elettriche, morfologiche e metaboliche. Queste includono un aumento della concentrazione intracellulare di calcio, la ripresa e il completamento del processo meiotico, cambiamenti delle proprietà elettriche della membrana plasmatica e l'inizio del programma di sviluppo [4].

1.2 *Proprietà elettriche degli ovociti*

La membrana plasmatica è il sottile rivestimento che delimita ogni cellula, la separa dall'ambiente esterno e regola lo scambio con esso. E' costituita da un doppio strato fosfolipidico in cui sono collocate le proteine.

Gli ovociti sono cellule elettrogeniche ossia capaci di cambiare le proprietà elettriche della membrana plasmatica in risposta a stimoli di vario genere. Le proprietà elettriche della membrana sono la capacità e la conduttanza. La capacità è determinata dall'impermeabilità agli ioni del doppio strato fosfolipidico, il quale separa le cariche elettriche creando una differenza di potenziale elettrico ai due lati della membrana che viene detto voltaggio. L'esistenza di questo gradiente elettrico genera a sua volta anche un accumulo di energia potenziale, detto "potenziale di riposo della cellula" (PR), che si misura in millivolts (mV) e che dipende principalmente dalla permeabilità della membrana e dalla diversa distribuzione ionica in particolare dello ione potassio (K^+) [5]. Nella maggior parte delle cellule il valore del PR oscilla tra -10 e -100 mV [6],

La conduttanza è la capacità della membrana plasmatica ad essere attraversata da cariche elettriche determinata dalla presenza dei canali ionici. Il flusso di cariche elettriche che attraversano i canali è detto "corrente ionica" e si misura in nanoAmpere (nA) o picoAmpere (pA) (Figura 1).

I canali ionici sono proteine integrali di membrana caratterizzati da:

- 1) un meccanismo controllato di apertura e di chiusura: il passaggio da uno stato di apertura ad uno di chiusura implica cambiamenti conformazionali della proteina indotti da stimoli specifici che possono essere di natura elettrica (canali voltaggio-dipendenti), chimica (canali a controllo di ligando) e meccanica (canali meccano-dipendenti).
- 2) la selettività: indica lo ione che attraversa la membrana quando il canale si trova in uno stato aperto; alcuni canali sono selettivi per un'unica specie ionica, altri invece sono aspecifici e consentono il passaggio di specie ioniche diverse (cationi o anioni).

La classe dei canali ionici voltaggio-dipendenti comprende: i canali di potassio (K^+) di cui sono stati identificati diversi tipi, i canali di sodio (Na^+), e i canali di calcio (Ca^{2+}) che a loro volta sono classificati in canali ad alta soglia di attivazione: tipo L, N, P/Q, R; e i canali a bassa soglia di attivazione: tipo T.

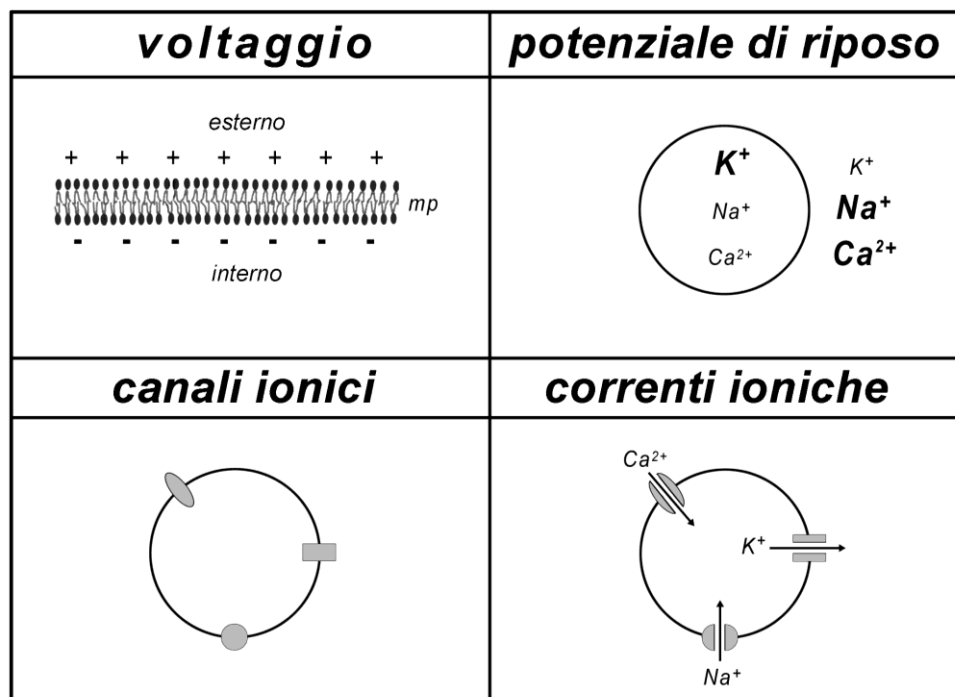


Figura 1. Rappresentazione schematica dei principali parametri elettrofisiologici. Il voltaggio è generato dalla distribuzione diseguale degli ioni positivi e negativi ai due lati della membrana. Questo gradiente elettrico genera un accumulo di energia potenziale detto potenziale di riposo. I canali ionici sono proteine situate nel doppio strato fosfolipidico che permettono il passaggio di specifici ioni attraverso la membrana plasmatica. La corrente ionica è il flusso di ioni attraverso i canali (modificato da [4]).

Il tipo e la densità di canali ionici presenti in una cellula dipendono dalla sua funzione e fisiologia [7].

L'ovocita maturo acquisisce, durante il processo di maturazione, le competenze per essere fecondato e supportare il successivo sviluppo embrionale. Prima dell'interazione con lo spermatozoo, l'ovocita è in uno stato di quiescenza metabolica ed è caratterizzato da una bassa conduttanza e da un' ampia varietà di canali ionici voltaggio-dipendenti sulla membrana plasmatica [8]. Le proprietà elettrofisiologiche di quest'ultima sono state ampiamente studiate in ovociti di diverse specie animali. La presenza dei canali di calcio negli ovociti fu dimostrata nel 1977 per la prima volta da Okamoto [9] nei mammiferi, negli echinodermi e nelle ascidie. Successivamente fu dimostrata la presenza di canali di sodio in ovociti di ascidia e anfibi e di canali di cloro in ovociti di anfibi [10,11]. Questi canali ionici sono coinvolti in differenti processi, dalla gametogenesi alla fecondazione fino allo sviluppo embrionale.

Il primo evento che si verifica alla fecondazione è un aumento della conduttanza della membrana plasmatica determinato dall'aumento dell'attività dei canali ionici di membrana [6]. L'interazione con lo spermatozoo infatti induce l'apertura di una popolazione di canali ionici detti canali di fecondazione che danno vita a una corrente elettrica detta corrente di fecondazione. Questa corrente induce un brusco cambiamento del PR, detto anche potenziale di fecondazione (FP) [12]. Negli invertebrati la depolarizzazione della membrana plasmatica rappresenta lo stimolo per l'attivazione ovocitaria [13] e/o il meccanismo per prevenire la polispermia [14,15]. Nonostante la corrente di fecondazione sia stata registrata in molte specie animali [16-19], la sua funzione non è stata del tutto chiarita. Numerosi studi ipotizzano che la corrente di fecondazione possa giocare un ruolo nel garantire un corretto sviluppo embrionale [20,21].

1.3 Riproduzione e Ambiente Marino

Il successo riproduttivo è il fattore chiave per la conservazione della specie. E' ben noto che l'inquinamento può compromettere il successo riproduttivo con notevole rischio per la sopravvivenza della popolazione [22].

Nella maggior parte degli organismi marini la fecondazione è esterna, i gameti sono rilasciati in acqua dove avviene la fusione e lo sviluppo embrionale. I gameti sono quindi continuamente esposti ad agenti inquinanti presenti nell'ecosistema marino che ne possono alterare la qualità o la quantità con conseguente riduzione del tasso di fecondazione e della probabilità di sopravvivenza della prole. Quest'ultima quando riesce a svilupparsi può a sua volta avere un ridotto potenziale riproduttivo.

Negli ultimi anni un crescente interesse è stato rivolto ad una particolare fonte di inquinamento le vernici antivegetative ampiamente utilizzate per far fronte al fenomeno del *biofouling* marino [23].

1.4 Biofouling

Il termine *fouling* deriva dal verbo inglese *to foul*, che significa letteralmente insudiciare, incrostare. Pertanto con il termine *biofouling* marino si indica l'accumulo e la crescita indesiderata di una comunità di organismi su una superficie, naturale o artificiale, sommersa (Figura 2). Il processo di *biofouling* consta di differenti fasi. Nella prima fase la superficie inizia a ricoprirsi di molecole organiche e composti inorganici che formano un biofilm primario a cui, nella seconda fase, aderiscono batteri e alghe costituendo un biofilm microbico. La produzione di secrezioni mucopolisaccaridiche consente, nella terza fase, l'adesione di spore, microalghe, funghi e protozoi. È a questo stadio che inizia la colonizzazione da parte di organismi pluricellulari, sia produttori

primari che degradatori. La fase finale è caratterizzata dall'attecchimento e dalla crescita di macroalghe e invertebrati marini come i balanidi, detti anche per la loro forma “denti di cane” e che includono molluschi, crostacei, policheti e tunicati [24,25] (Figura 3).



Figura 2. Esempio di *biofouling*

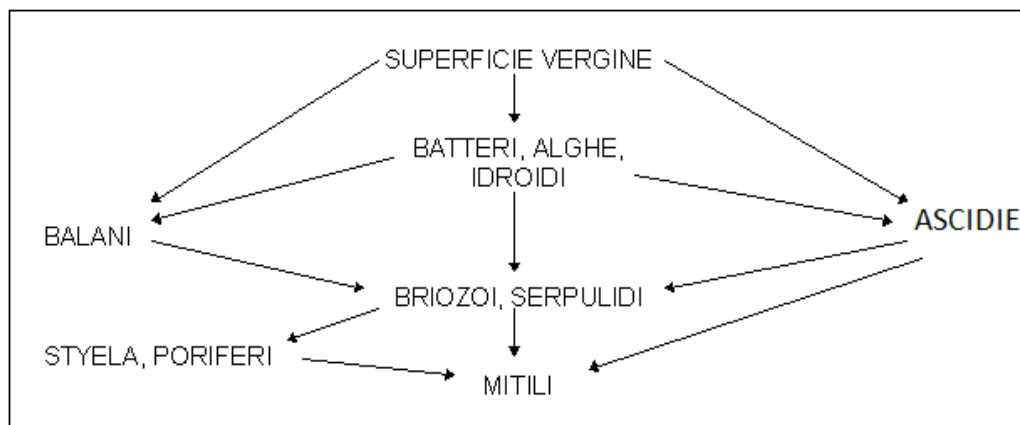


Figura 3. Rappresentazione schematica del processo di *biofouling* (modificato da [25]).

1.5 Sistemi Antifouling: Le vernici antivegetative

Al fine di contrastare il fenomeno del *biofouling* sono stati messi a punto dei rivestimenti protettivi che rendono la superficie esposta inadatta alla colonizzazione. Attualmente il metodo più diffuso, pratico ed immediato è rappresentato dall'applicazione di vernici antivegetative. Queste contengono un biocida, componente attivo, che impedisce la crescita e l'insediamento di balanidi, una resina che costituisce il film di pittura e controlla il rilascio del biocida, un pigmento e un solvente. A contatto con l'acqua di mare, per fenomeni chimico-fisici, il biocida viene rilasciato in essa dove forma uno strato di rivestimento intorno alla superficie immersa costituendo una barriera che ostacola l'adesione degli organismi marini. Affinché la vernice antivegetativa risulti efficace, il tasso di rilascio del biocida deve essere strettamente controllato cioè abbastanza elevato da impedire l'insediamento di organismi marini ma non eccessivamente elevato da indurre contaminazione ambientale [26]. Differenti tipi di sostanze sono state utilizzate come biocidi nelle vernici antivegetative. Nel diciottesimo secolo si svilupparono le prime vernici antivegetative contenenti rame, arsenico e mercurio [27]. Le vernici antivegetative a base di rame sono state ampiamente utilizzate poiché molto efficaci; essendo questa efficacia di breve durata erano però richieste frequenti ri-applicazioni della vernice stessa [24,28]. Con la scoperta negli anni '50 delle proprietà biocida dei composti organostannici tri-sostituiti, in particolare del tributil stagno (TBT), nuove vernici antivegetative a base di TBT iniziarono ad essere prodotte e ampiamente utilizzate in tutto il mondo per la loro efficacia che risultava inoltre di lunga durata. In seguito però è stata progressivamente riscontrata la pericolosità e azione negativa del TBT su organismi diversi da quelli bersaglio e pertanto diversi paesi hanno emanato leggi che progressivamente riducevano l'utilizzo delle vernici antivegetative a base di TBT fino ad arrivare al completo divieto

di uso in anni recenti. In seguito al bando d'uso dei composti organici dello stagno, sono state sviluppate nuove vernici antivegetative contenenti biocidi alternativi, definiti biocidi organici [27].

Lo studio del *biofouling* presenta problemi sia di tipo economico che ambientale. Da un punto di vista economico, il *biofouling* costringe gli armatori e i proprietari di imbarcazioni da diporto a forti spese per la manutenzione necessaria per evitare la perdita di velocità provocata dalla presenza delle incrostazioni marine sullo scafo, per l'operazione di pulizia dello scafo e per il ripristino del rivestimento protettivo.

Da un punto di vista ambientale, il biocida diffonde nell'ambiente marino adiacente dove sono presenti altri animale e piante, esercitando su questi organismi "non-target" effetti tossici [29].

1.6 TBT: Struttura e Proprietà

Il TBT è un composto organico dello stagno tri-sostituito caratterizzato dalla presenza di legami covalenti tra un atomo di stagno e tre atomi di carbonio (Figura 4). Chimicamente è rappresentato dalla formula generale $(n-C_4H_9)_3Sn-X$, dove X è una specie anionica generalmente inorganica. La natura del gruppo anionico inorganico legato influenza le proprietà chimico-fisiche, in particolare la solubilità in acqua e in solventi non polari e la tensione di vapore [30]. In generale, la tossicità e la capacità di interagire con i sistemi biologici dei composti organostannici variano in funzione del numero e del tipo dei gruppi organici legati allo stagno, queste risultano essere massime per i tri-sostituiti, e diminuiscono progressivamente nei di- e mono- sostituiti [30,31].

1.6.1 Storia e applicazioni

Nel 1950 il gruppo di ricerca diretto dal professor GJM van der Kerk dimostrò le proprietà biocide del TBT. In seguito a questa scoperta, il TBT fu utilizzato in numerose applicazioni: come fungicida in agricoltura, nel settore tessile e nel settore delle acque industriali, conservante del legno, acaricida, disinfettante, molluschicidi, nematocidi, rodenticidi (Figura 5) [32-34]. Inizialmente il TBT venne anche utilizzato come biocida di supporto nelle vernici a base di rame, successivamente vista la maggiore efficacia rispetto al rame, le vernici a base di TBT andarono incontro ad una vasta diffusione mondiale [33]. Le diverse e numerose applicazioni del TBT fanno sì che direttamente o indirettamente questo venga rilasciato nell'ambiente marino.

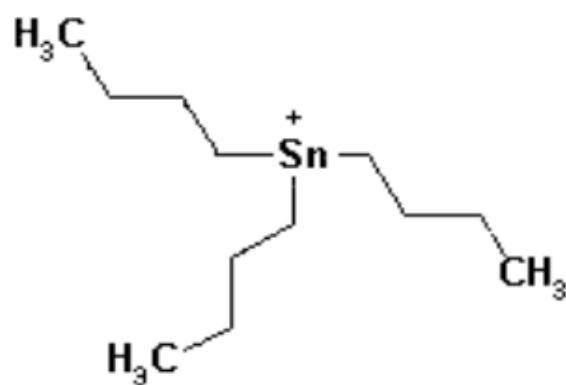


Figura 4. Formula di struttura di TBT

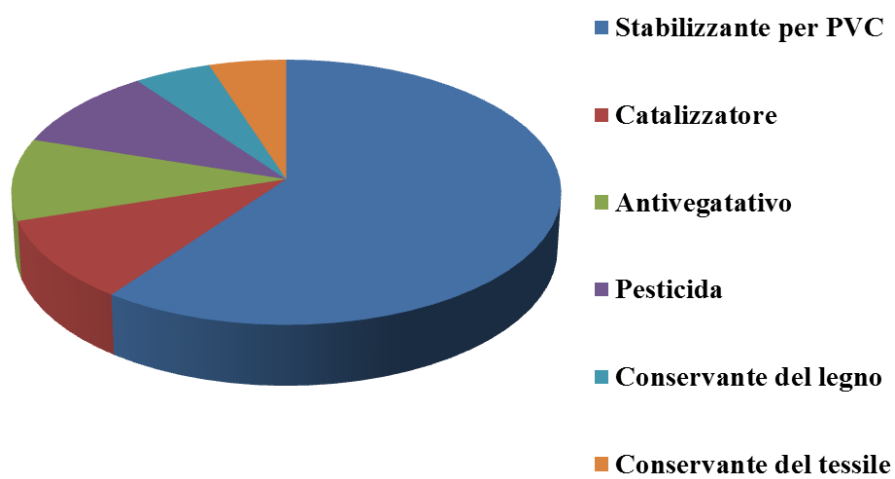


Figura 5. Differenti applicazioni del TBT

1.6.2 Presenza e speciazione in ambiente marino

La principale via di immissione del TBT in ambiente marino è il rilascio da parte delle vernici antivegetative; altre fonti di immissione possono essere i percolati di lisciviazione dei rifiuti e gli scarichi industriali e civili (Figura 6).

La principale via di eliminazione in questo caso risulta essere la sedimentazione nei fanghi di depurazione [35], i quali sono spesso impiegati come ammendanti in agricoltura, mentre in molti paesi vengono smaltiti scaricandoli in mare, in entrambi i casi essi diventano una nuova fonte di inquinamento per l'ambiente marino.

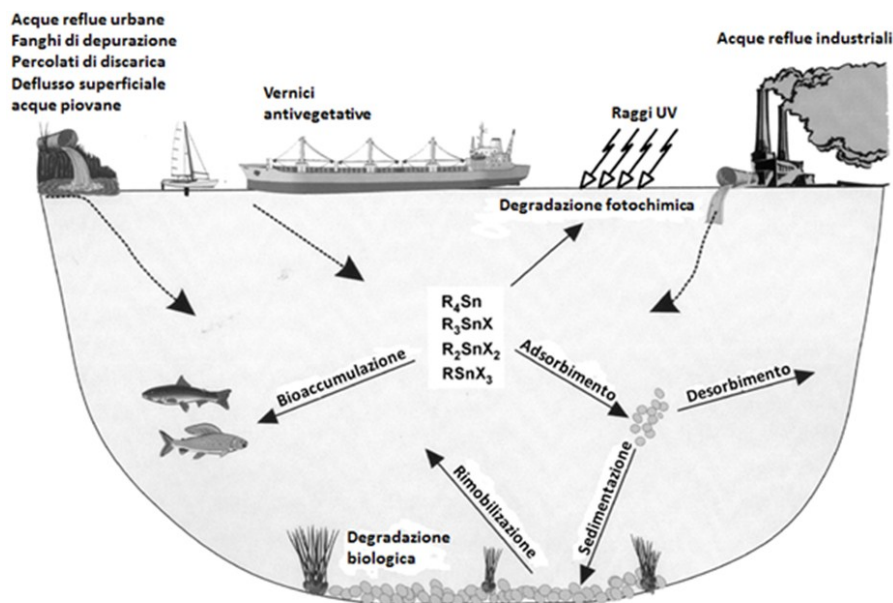


Figura 6. Distribuzione e destino dei composti organostannici e loro cicli nell'ambiente marino (modificato da [32]).

I fenomeni di speciazione in acqua di mare sono dipendenti dal pH, salinità, temperatura e dalla composizione ionica [36]. Il TBT in fase acquosa instaura equilibri tra la sua forma cationica (TBT^+) e le forme TBT-OH e TBT-Cl [37].

La forma cationica, TBT^+ , può essere attratta dalle cariche negative di minerali ed essere trattenuta nello strato diffuso di cationi che circondano la superficie carica negativamente.

L'adsorbimento può avvenire anche attraverso interazioni specifiche tra l'atomo di stagno, ligandi di superficie dei sedimenti minerali e gruppi funzionali polari della materia organica. I sedimenti vengono quindi identificati come potenziali depositi ambientali di TBT. Studi di desorbimento hanno comunque dimostrato che l'adsorbimento su particelle solide è un processo reversibile e quindi, i sedimenti possono anche agire da sorgente di nuova contaminazione [38,39].

La letteratura riporta dati discordanti sui tempi di degradazione dei composti organostannici. Per quanto riguarda le acque naturali si trovano valori di tempo di dimezzamento che vanno dai 4 ai 14 giorni [29] fino a 6 settimane - 5 mesi [30]. Nei sedimenti, invece, secondo alcuni autori, il tempo di dimezzamento del TBT è dell'ordine di mesi [40], secondo altri dell'ordine delle decine di anni [41].

La degradazione dei composti organostannici avviene per dealchilazione sequenziale dei gruppi alchilici legati all'atomo di stagno e questo comporta una generale riduzione della tossicità di questi composti. Questo processo può avvenire per via biotica e abiotica. Nel caso della degradazione di tipo chimico i fattori principali sono le radiazioni ultraviolette (ed in particolare quelle con lunghezze d'onda vicine ai 290 nm) e la rottura chimica di tipo eterolitico per effetto di reagenti sia nucleofili che elettrofili (ad esempio acidi minerali, acidi carbossilici e metalli alcalini). È stato anche dimostrato che i processi biotici rappresentano il meccanismo principale di

degradazione del TBT nei suoli, in acqua dolce e marina e negli ambienti d'estuario [42]. Tale degradazione avviene in batteri, alghe e funghi ma non sono ancora stati chiariti del tutto i meccanismi di degradazione e la tolleranza dei microorganismi verso i composti organostannici.

1.6.3 Rilevanza ambientale

Goldberg [43] ha definito il TBT come la sostanza più tossica che l'uomo abbia mai deliberatamente introdotto nell'ambiente marino. I livelli di tossicità del TBT sono correlati alla concentrazione, al tempo di esposizione, alla biodisponibilità e alla sensibilità del biota [44].

Studi condotti *in vivo* e *in vitro* hanno dimostrato che il TBT è estremamente tossico per gli organismi marini già a concentrazioni nanomolari.

I primi effetti tossici del TBT furono dimostrati alla fine degli anni '70, quando emerse il caso della Baia di Arcachon in Francia, famosa per l'allevamento di ostriche. Essendo la baia anche centro di navigazione da diporto ciò determinò una contaminazione di questo sito da parte del TBT. L'incremento di concentrazione di TBT indusse anomalie nella calcificazione delle conchiglie delle ostriche *Crassostrea gigas* e una diminuzione nella riproduzione determinando un crollo della produzione di circa il 70% [45].

Successivamente nel 1981 Smith osservò lo sviluppo di caratteri genitali maschili in femmine di gastropodi, fenomeno definito *imposex* [46]. Studi in laboratorio e in campo dimostrarono che l'imposex è determinato dall'esposizione a concentrazioni nanomolari di TBT [47]. Il TBT infatti agisce da distruttore endocrino andando ad inibire l'enzima citocromo P450 aromatasi, che catalizza la conversione degli androgeni in estrogeni, con conseguente aumento dei livelli di testosterone [48].

Poiché il grado di sviluppo è dose-dipendente, l'*imposex* è stato ampiamente impiegato come bioindicatore della presenza di TBT in molti programmi di monitoraggio ambientale [47,49].

L'*imposex* mostra conseguenze differenti a seconda delle specie. In alcune specie la presenza di tratti genitali maschili non interferisce con l'attività riproduttiva, in altre invece i caratteri genitali femminili risultano alterati con conseguente inibizione della riproduzione [31,50].

Differentemente dall'*imposex*, l'*intersex*, cioè la mascolinizzazione dell'ovidutto, è determinato dall'esposizione ad alte concentrazioni di TBT. Questo fenomeno rende la femmina sterile con conseguente rischio di estinzione della popolazione [33].

In molte altre specie marine sono stati inoltre dimostrati effetti tossici del TBT sulla crescita, lo sviluppo, la riproduzione e la sopravvivenza degli organismi [30], inducendo tra l'altro immunotossicità [51,52], apoptosi [31] e danno mitocondriale [47,53].

Il TBT agisce attraverso molteplici meccanismi di tossicità. Tra questi va inclusa la capacità del TBT, dovuta alle sue caratteristiche lipofile, di inserirsi nel doppio strato fosfolipidico delle membrane biologiche variandone le proprietà fisiche, la permeabilità e le caratteristiche funzionali. L'aumento della permeabilità della membrana plasmatica, determinata dall'inserimento in essa del TBT, altera il gradiente ionico transmembranale con conseguente ripercussione sui processi di regolazione ionica e il mantenimento dell'omeostasi cellulare [54].

Un altro meccanismo di tossicità legato all'incorporazione dei composti organostannici nelle membrane biologiche è l'attivazione della perossidazione lipidica [55].

Il TBT danneggia non solo la membrana cellulare ma anche quella mitocondriale con conseguente alterazione del processo di fosforilazione ossidativa mitocondriale e la riduzione dell'efficienza energetica dei mitocondri [56,57].

Oltre ad interagire con la membrana plasmatica cellulare il TBT riesce anche ad attraversarla raggiungendo facilmente l'ambiente intracellulare dove interagendo con diverse biomolecole amplifica il suo effetto tossico. In particolare è noto che l'atomo di stagno può formare legami covalenti con i gruppi tiolici delle proteine determinandone un cambiamento conformazionale con conseguente alterazione della loro funzione [58].

L'alterazione dell'espressione genica rappresenta un ulteriore meccanismo di tossicità del TBT. Il processo di acetilazione degli istoni è fondamentale per la regolazione dell'espressione genica ed è catalizzato dall'enzima istone acetiltransferasi. Differenti studi hanno dimostrato che il TBT incrementa l'attività di questo enzima con conseguente alterazione del processo di acetilazione degli istoni [59].

1.6.4 Legislazione

A seguito dell'episodio della Baia di Arcachon, la Francia fu il primo Paese a varare, nel 1982, una legge restrittiva dell'uso dei composti organostannici. Seguirono provvedimenti analoghi in molti altri paesi, tra cui il Regno Unito, gli Stati Uniti, Svizzera, Germania e Giappone. In Italia, il primo intervento legislativo fu emanato nel 1982 quando il D.P.R. n. 904 del 10/09/82 recepì la direttiva CEE n. 75/769 relativa alla immissione sul mercato ed all'uso di sostanze e preparati pericolosi. Tale legge si distingue da quelle varate in altri Paesi poiché i divieti imposti non riguardavano unicamente l'uso, ma anche la vendita delle vernici antivegetative.

Nell'ottobre 2001, l'Organizzazione Marittima Internazionale (IMO), facente parte delle Nazioni Unite, ha adottato la "Convenzione internazionale per il controllo dei sistemi antivegetativi nocivi applicati sulle navi" (AFS), la quale bandiva, a partire dal 1° gennaio 2003, l'utilizzo di vernici antivegetative contenenti TBT e altri componenti a base di stagno e stabiliva la data del 1° gennaio 2008 come il termine ultimo per la rimozione completa delle vernici contenenti stagno dagli scafi delle navi.

Il Decreto Ministeriale n. 367 del 6 novembre 2003, "Regolamento concernente la fissazione di standard di qualità nell'ambiente acquatico per le sostanze pericolose", pose il TBT tra le sostanze pericolose prioritarie e stabilì degli standard di qualità per la matrice acquosa e per i sedimenti delle acque marino-costiere, lagunari e degli stagni costieri.

Lo standard che doveva essere raggiunto nelle matrici acquose entro il 31 dicembre 2008 era di 0.01 µg/l per il dibutilstagno catione e di 0.001 µg/l per il tributilstagno catione. I valori da raggiungere entro il 31 dicembre 2015 si abbassano a 0.001 µg/l per il dibutilstagno catione e 0.0001 µg/l per il tributilstagno catione.

Lo standard di qualità per i sedimenti delle acque marino-costiere, lagunari e degli stagni costieri è stato fissato a 5 µg/kg.

1.7 Biocidi organici di nuova generazione

La messa al bando dei composti organostannici ha reso necessario lo sviluppo di vernici antivegetative "TBT-free" che risultino efficaci come quelle a base di composti organostannici ma con un impatto minimo sull'ambiente. Le vernici antivegetative "TBT free" presentano come additivi numerosi biocidi. Tra i diciotto biocidi organici attualmente utilizzati nella formulazione di pitture antivegetative di nuova generazione

(clorotalonil, diclofluanid, irgarol, TCMS piridina, TCMS, diuron, sea-nine211, zinco piritione e zineb [28], il diuron è tra quelli più utilizzati. Negli ultimi anni il suo livello nelle acque e nei sedimenti è notevolmente aumentato, determinando un crescente interesse per i possibili effetti ecotossici di questo composto.

1.8 Diuron: *Struttura e proprietà*

Il diuron (3-(3,4-diclorofenil)-1,1 dimetilurea) è un erbicida appartenente alla classe chimica dei derivati delle feniluree (Figura 7). L'attività erbicida è associata alla struttura fenil-N,N'-dimetilureica. Infatti la fitotossicità diminuisce se viene rimosso il sostituito N-alchilico o se ne viene aumentata la dimensione. Il meccanismo d'azione biochimico primario si esplica mediante l'inibizione della fotosintesi bloccando il trasporto degli elettroni. In particolare, il blocco del trasporto degli elettroni determina una riduzione dell'assorbimento di diossido di carbonio con conseguente calo della produzione di carboidrati da parte della pianta [60].

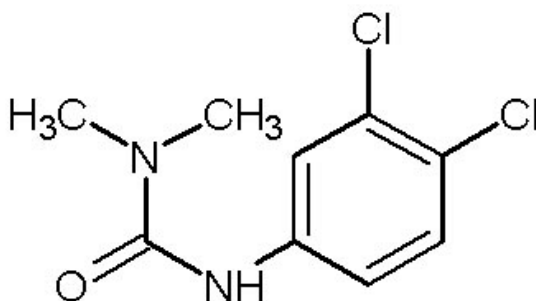


Figura 7. Formula di struttura del Diuron

La solubilità in acqua viene profondamente modificata dalla progressiva sostituzione dei gruppi ammidici dell'urea e dal numero di atomi di cloro eventualmente presenti nella molecola; in generale la solubilità diminuisce con l'aumentare della clorurazione.

1.8.1 *Storia ed applicazioni*

Il diuron è stato introdotto in Italia nel 1972 da Ravit e utilizzato per il controllo delle erbacce e dei muschi in agricoltura e non. In agricoltura è usato in molti tipi di coltura come frutta, cotone e canna da zucchero. L'impiego non agricolo di questo composto prevede applicazioni in gasdotti, linee elettriche, linee ferroviarie, strade, parchi, aree di stoccaggio, fontane e opere civili [61]. Viene utilizzato nelle vernici antivegetative come algicida in quanto inibisce la fotosintesi bloccando il trasferimento degli elettroni nel fotosistema II.

1.8.2 *Presenza e speciazione in ambiente marino*

La presenza del diuron in ambiente marino è dovuta sia al rilascio da parte delle vernici antivegetative sia agli scarichi agricoli. In ambiente marino è stato ritrovato principalmente disciolto in fase acquosa anche se può legarsi alle particelle sospese e ai sedimenti, da cui viene successivamente rilasciato (Figura 8) [61].

In ambiente marino il diuron è molto persistente, i suoi tempi di degradazione oscillano da un mese ad un anno. La degradazione può avvenire mediante processi abiotici e biotici. I processi abiotici comprendono l'idrolisi e la fotolisi. La velocità di idrolisi del diuron è molto bassa, tuttavia è un processo irreversibile che dà origine ad un unico prodotto aromatico la 3,4-dicloroanilina. La fotolisi è determinata dall'assorbimento di

radiazioni ultraviolette con lunghezza d'onda compresa tra 200 e 300 nm. La fotodegradazione del diuron nell'ambiente marino indotta dai raggi ultravioletti del sole è ridotta determinando una lunga emivita di questo composto [62]. Il principale meccanismo di degradazione del diuron è il processo biotico promosso da batteri, attinomiceti e funghi in condizioni aerobiche e anaerobiche [61].



Figura 8. Immissione e destino del diuron nell'ambiente marino modificato da [63]

1.8.3 Rilevanza Ambientale

A differenza di altri biocidi, il diuron è stato ritrovato in ambiente marino con maggior frequenza e concentrazione [27]. Tuttavia non vi sono molte informazioni sugli effetti ecotossici di questo biocida sugli organismi marini.

Essendo un inibitore del processo fotosintetico, il diuron risulta essere estremamente tossico per le piante acquatiche a concentrazioni molto basse. Risulta invece moderatamente tossico per i pesci e leggermente tossico per gli invertebrati marini [61]. Differenti studi hanno dimostrato che il diuron esercita un effetto tossico sullo sviluppo embrionale di differenti specie di pesci, molluschi ed echinodermi. Nei pesci, l'esposizione al diuron provoca una riduzione della schiusa e del normale sviluppo embrionale, inoltre la progenie presenta deformità nella colonna vertebrale [64]. Alterazioni dello sviluppo embrionale sono state inoltre osservate in differenti specie di riccio di mare e nelle ostriche [65-67]. Test di spermiotossicità hanno inoltre dimostrato che questo biocida esercita un effetto tossico anche sui gameti maschili. Infatti spermatozoi di riccio di mare esposti al diuron mostrano una riduzione della capacità fecondante e danni permanenti trasmissibili alla progenie [66]. Nelle ostriche, il diuron induce un effetto genotossico negli spermatozoi [65].

I meccanismi mediante i quali il diuron esercita la sua azione tossica non sono stati ancora identificati, ulteriori studi sono quindi necessari dato l'impatto di questo biocida sui processi riproduttivi con conseguente danno delle popolazioni.

1.8.4 Legislazione

L'Unione europea ha definito un quadro comunitario per la protezione e la gestione dell'acqua (Direttiva 2000/60/CE). Tale direttiva individua un elenco di sostanze prioritarie tra le quali si annovera il diuron. La successiva Direttiva 2008/105/CE (Tabella 1A) del Parlamento europeo fissa gli standard di qualità ambientale in relazione alla presenza nelle acque di sostanze o di gruppi di sostanze prioritarie in base al rischio significativo che rappresentano per l'ambiente acquatico o da esso generato.

Tabella. 1/A Standard di qualità per le sostanze dell'elenco di priorità

N	NUMERO CAS	(1)	Sostanza	(µg/l)		
				SQA-MA ⁽²⁾ (acque superficiali interne) ⁽³⁾	SQA-MA ⁽²⁾ (altre acque di superficie) ⁽⁴⁾	SQA-CMA ⁽⁵⁾
15	330-54-1	P	Diuron	0,2	0,2	1,8

Note alla Tabella 1/A

(1) La sostanza contraddistinta dalla lettera P è una sostanza prioritaria.

(2) Standard di qualità ambientale espresso come valore medio annuo (SQA-MA).

(3) Per acque superficiali interne si intendono i fiumi, i laghi e i corpi idrici artificiali o fortemente modificati.

(4) Per altre acque di superficie si intendono le acque marino-costiere, le acque territoriali e le acque di transizione.

(5) Standard di qualità ambientale espresso come concentrazione massima ammissibile (SQA-CMA).

Il diuron è sicuramente il biocida più ampiamente utilizzato nella formulazione di pitture antivegetative di nuova generazione, di conseguenza la sua concentrazione in ambiente marino è progressivamente aumentata. In Inghilterra infatti l'Environment Agency ha dimostrato che il diuron è tra i biocidi che più frequentemente viene rilevato a concentrazioni superiori allo standard di qualità ambientale [68].

Le sempre più frequenti situazioni di emergenza in campo ambientale hanno stimolato, nel corso degli anni, numerosi interventi legislativi sia a livello nazionale che europeo, al fine di imporre dei limiti massimi di emissione di questo biocida. Nell'ambito europeo, in Inghilterra e Danimarca, l'applicazione di vernici antivegetative contenenti il diuron è consentita solo su imbarcazioni di lunghezza inferiore ai 25 metri; tale provvedimento non è stato invece adottato in paesi quali Francia, Grecia, Paesi Bassi e Italia [27]. Nel corso degli anni, dunque, il susseguirsi dei provvedimenti normativi ha evidenziato la necessità di ulteriori studi ecotossicologici al fine di implementare gli standard di qualità delle acque per proteggere gli organismi marini.

1.9 Saggi ecotossicologici

I saggi di tossicità hanno come obiettivo la valutazione degli effetti degli inquinanti sugli organismi come conseguenza dell'alterazione di risposte biologiche quali la mortalità, anomalie dello sviluppo, modificazioni comportamentali e cambiamenti nel successo riproduttivo. La specie utilizzata in questo tipo di test deve presentare una serie di requisiti: facile reperimento e gestione, reagire in maniera osservabile alle modificazioni del suo ambiente la cui risposta deve risultare ad una soglia di

sensibilità piuttosto bassa, e in qualche modo proporzionale all'intensità della modificazione, ciclo vitale non troppo lungo e una biologia ben nota.

Numerose specie sono utilizzate come organismi modello per valutare gli effetti tossici degli inquinanti, tra cui le ascidie che forniscono criteri biologici per la valutazione della qualità dell'ambiente marino contribuendo al rilevamento della presenza di sostanze chimiche nocive [69]. Le ascidie infatti rappresentano un buon organismo modello per condurre saggi di tossicità in quanto offrono numerosi e differenti vantaggi [70].

1.10. *Le ascidie*

La classe degli ascidiacei, con circa 1.600 specie, appartiene al phylum degli cordati (Figura 9). Le ascidie, dette anche tunicati poiché il loro corpo è coperto da una tunica colorata e a volte dura, sono classificate nell'ambito di tale phylum in quanto possiedono tre caratteristiche distintive tipiche dei cordati quali una notocorda, una corda nervosa dorsale cava e fessure faringee (Figura 10A). Tali caratteristiche sono però riscontrabili solo nello stadio larvale e si perdono nell'adulto.

Le ascidie sono invertebrati marini ubiquitari e sessili che vivono, in colonie o solitarie, in acque poco profonde, attaccate con un'estremità della loro struttura tubulare a vari substrati naturali e non quali: rocce, chiglie di navi, corde e sabbie. All'altra estremità presentano invece due sifoni, uno boccale e uno cloacale, che consentono il passaggio di una corrente d'acqua attraverso il corpo dell'animale, essi sono filtratori (Figura 10B).

Le ascidie sono ermafrodite insufficienti, possiedono un testicolo ed un unico ovario che giacciono in stretto contatto con l'ansa intestinale. Il testicolo giace al di sotto

dell'ovario ed è formato da un grappolo di piccole sacche che confluiscono nello spermidutto. Tale dotto si muove parallelamente all'ovidutto, in cui vengono trasportati gli ovociti maturi, ed entrambi sboccano nella cloaca alla base del sifone atriale. La fecondazione è esterna pertanto gli ovociti e gli spermatozoi sono liberati nell'acqua.

<u>Classificazione</u>	
<u>Dominio</u>	<u>Eukaryota</u>
<u>Regno</u>	<u>Animalia</u>
<u>Sottoregno</u>	<u>Eumetazoa</u>
<u>Ramo</u>	<u>Bilateria</u>
<u>Superphylum</u>	<u>Deuterostomia</u>
<u>Phylum</u>	<u>Chordata</u>
<u>Subphylum</u>	<u>Tunicata</u>
<u>Classe</u>	<u>Ascidiacea</u>
<u>Ordine</u>	<u>Enterogona</u>
<u>Sottordine</u>	<u>Phlebobranchia</u>
<u>Famiglia</u>	<u>Cionidae</u>
<u>Genere</u>	<u>Ciona</u>
<u>Specie</u>	<i>C. intestinalis</i>

Figura 9. Classificazione della *Ciona intestinalis*.

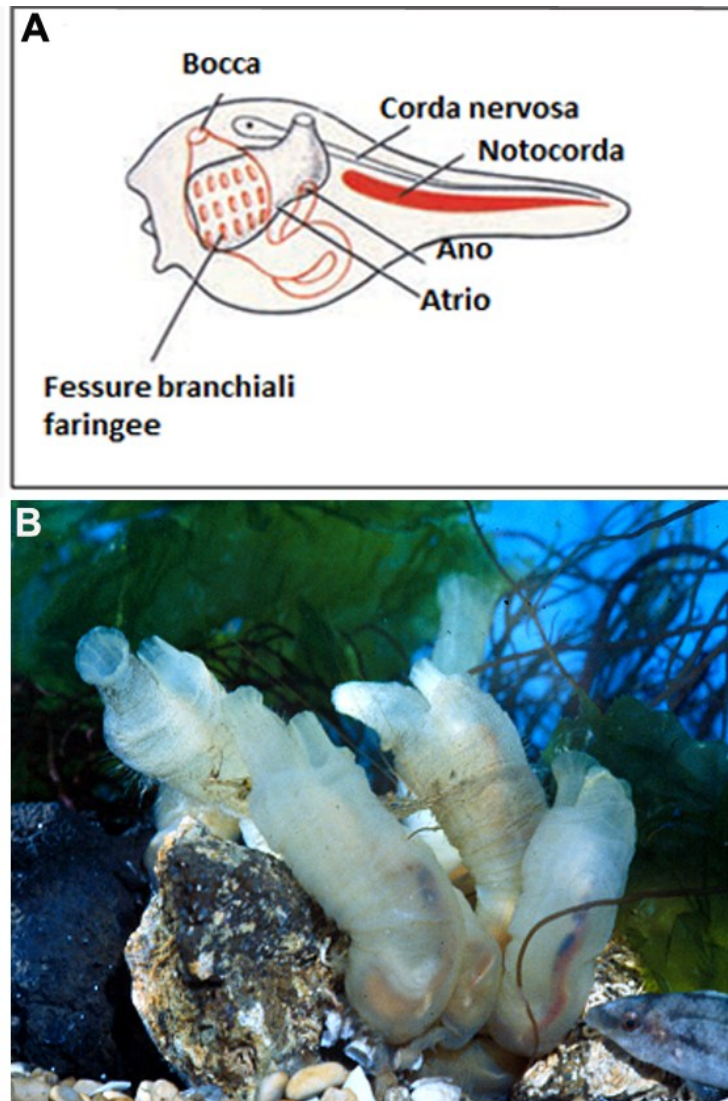


Figura 10. *Ciona intestinalis* A) stadio larvale; B) colonia di animali adulti in cui sono chiaramente visibili i dotti contenenti gli ovociti e gli spermatozoi

1.10.1. Ciclo riproduttivo dell'ascidia *Ciona intestinalis*

Nell' ascidia *Ciona intestinalis* gli ovociti maturi, pronti per la fecondazione, sono bloccati alla prima metafase del processo meiotico (MI) e presentano alcune strutture accessorie: la membrana vitellina molto spessa detta *corion*, la quale è circondata da uno strato di cellule allungate dette cellule follicolari che rivestono diversi ruoli riconosciuti [71] (Figura 11A).

Al momento dell'ovulazione, l'ovocita maturo viene rilasciato nell'acqua di mare dove viene fecondato da spermatozoi prevalentemente appartenenti ad un altro organismo.

La fecondazione riavvia il ciclo meiotico facendo estrudere il primo e poi il secondo globulo polare nell'arco di 20 minuti circa (Figura 5B). Dopo circa 50 minuti, lo zigote si divide per mitosi in due blastomeri, destro e sinistro, secondo un piano meridiano lungo l'asse animale/vegetativo (A/V) (Figura 11C). Da questo momento le successive divisioni cellulari procedono ogni 35 minuti circa. La seconda divisione avviene ancora secondo un piano meridiano dando vita a quattro blastomeri (Figura 11D). Il terzo piano di divisione è equatoriale e divide l'embrione in otto blastomeri (Figura 11E). Allo stadio di trentadue blastomeri si ha la formazione della blastula mancante del blastocoele e allo stadio di centodieci blastomeri inizia il processo di gastrulazione (Figura 11F). Allo stadio di tarda gastrula si ha la formazione della piastra neurale dalla quale inizia il processo di neurulazione. Successivamente lo sviluppo della notocorda con conseguente allungamento della coda daranno origine, dopo 24 ore circa, ad una larva mobile, liberata dalle strutture accessorie, che ha la forma caratteristica di un girino (Figura 11G).

Questo stadio è particolarmente avanzato rispetto all'animale adulto, in quanto consta di una corda, un sistema nervoso e degli organi di senso. Queste strutture si perdono durante la metamorfosi, quando la corda viene riassorbita e gli organi di senso scompaiono, dando vita ad un animale adulto invertebrato [71].

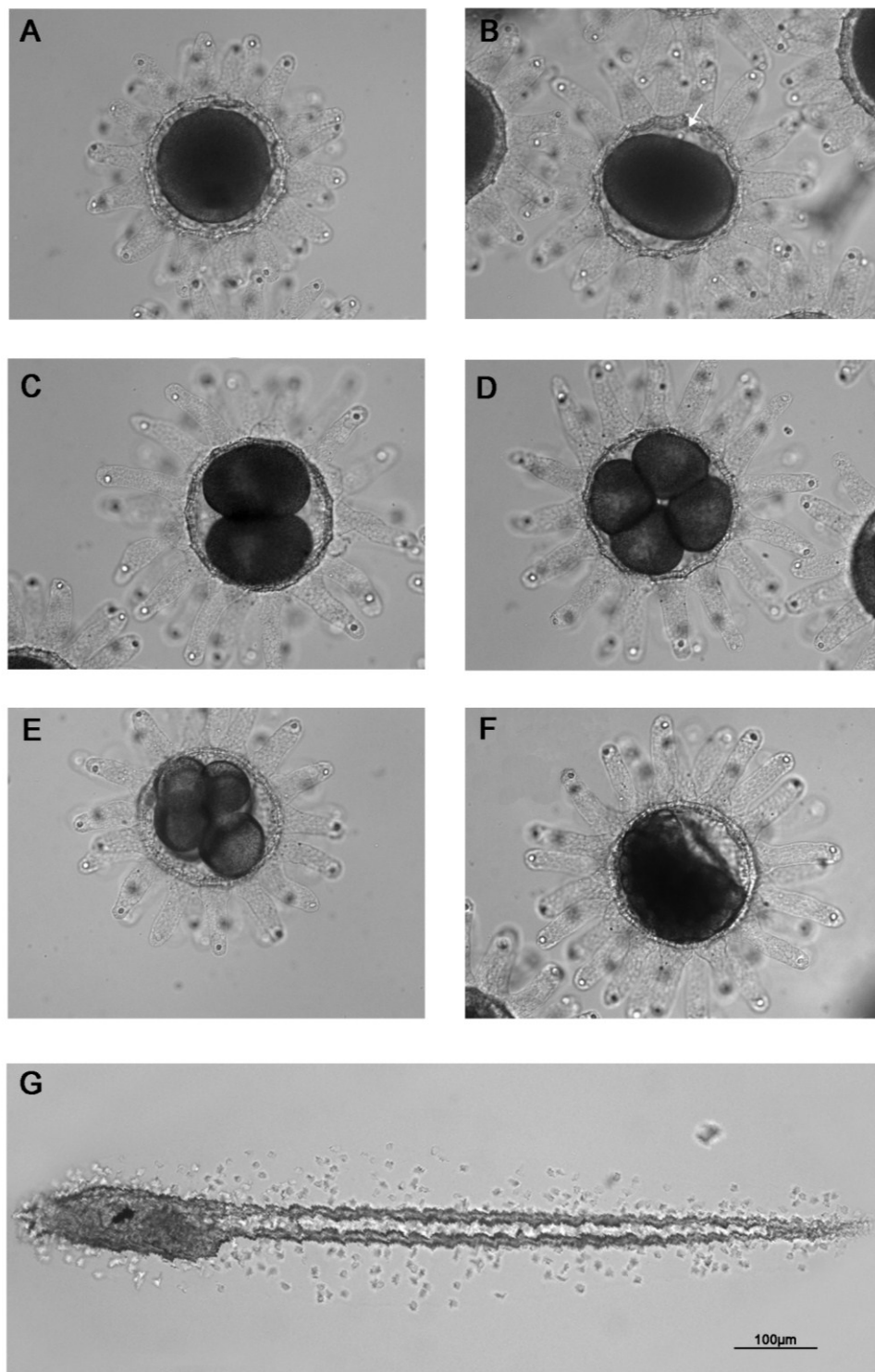


Figura 11. Stadi di sviluppo embrionale di *Ciona intestinalis*. A) l'ovocita maturo allo stadio di MI; B) lo zigote; la freccia indica il globulo polare; C) stadio a due blastomeri; D) stadio a 4 blastomeri; E) stadio a 8 blastomeri; F) stadio di gastrula; G) larva natante.

1.10.2. Proprietà elettriche degli ovociti di ascidie

Nelle ascidie, i primi studi sulle proprietà elettriche sono stati effettuati da Block e Moody [11], i quali identificarono negli ovociti di *Boltenia villosa* la presenza di tre principali correnti ioniche transienti, in entrata e modulate dal voltaggio: 1) corrente di sodio; 2) corrente di calcio; 3) corrente di potassio. Nella *Ciona intestinalis*, uno studio sulle proprietà elettriche dell'ovocita [20,72] ha mostrato un ruolo dei canali di calcio voltaggio dipendenti di tipo L nello stadio immaturo di vescicola germinale che decresce allo stadio maturo di MI, facendo quindi supporre un possibile ruolo di questi canali nella crescita dell'ovocita immaturo in particolare volto al riempimento delle riserve intracellulari di calcio, a sostegno della contrazione post-fecondazione. In questo stadio avviene la comparsa di un'attività dei canali di sodio che permane oltre la fecondazione.

L'interazione con lo spermatozoo determina nell'ovocita una serie di modificazioni elettriche, morfologiche e metaboliche [12]. Nelle ascidie, il primo evento di fecondazione è una corrente ionica in entrata accompagnata dalla depolarizzazione del potenziale di riposo [8,12]. Questa corrente è definita corrente di fecondazione ed è generata dall'apertura di canali ionici aspecifici, detti canali di fecondazione [12,73,74].

La corrente di fecondazione è seguita dalla contrazione del corpo cellulare, un processo quest'ultimo peculiare delle ascidie e dovuto alla mancanza dei granuli corticali. La contrazione è determinata dall'onda di calcio che attraversa l'ovocita dal polo vegetativo a quello animale [75]. Questo processo è temporaneo e l'ovocita ritorna alla sua classica forma sferica entro circa un minuto (Figura 12).

Agli eventi elettrici e al rilascio di calcio fanno seguito una serie di eventi metabolici a cascata. Tra questi si annoverano la mobilitazione dei fosfoinositidi di membrana, il

rilascio di alcuni messaggeri come fosfatidilinositolotrifosfato e diacilglicerolo (DAG), un aumento di poche unità di pH, l'inattivazione del *maturation promoting factor* (MPF) e la ripresa meiotica [3,76,77].

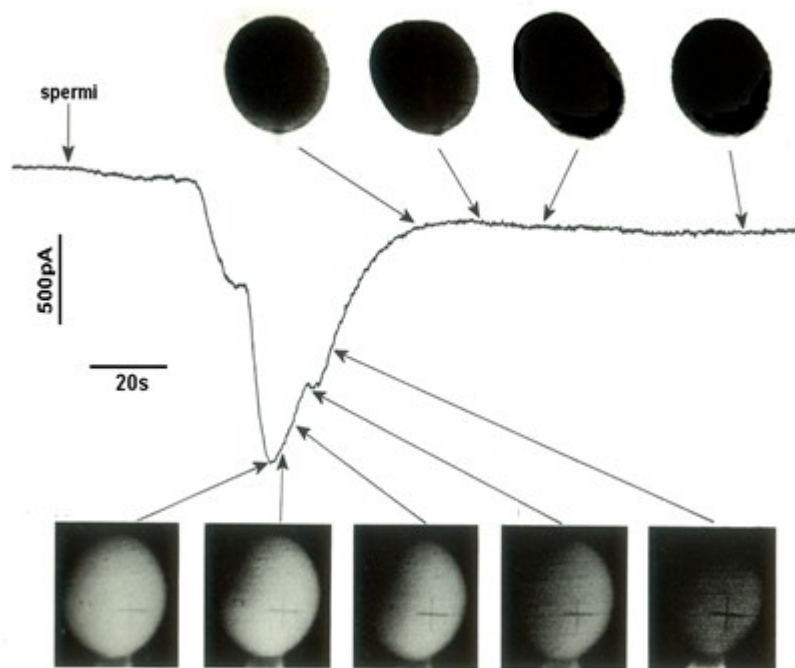


Figura 12. La corrente di fecondazione (centro), la contrazione dell'ovocita fecondato (alto) e l'onda di calcio (basso), sono gli eventi cui va incontro l'ovocita di *Ciona intestinalis* dopo l'interazione con lo spermatozoo [75].

2. SCOPO DELLA RICERCA

L'obiettivo di questa tesi è stato quello di valutare e comparare gli effetti di due biocidi rilasciati dalle vernici antivegetative quali il TBT e il diuron sui processi riproduttivi della ascidia *Ciona intestinalis*.

Con la tecnica elettrofisiologica del *whole-cell voltage clamp* abbiamo testato l'influenza di questi biocidi sulle proprietà elettriche dell'ovocita maturo quali la conduttanza della membrana plasmatica e le correnti ioniche, e sugli eventi elettrici della fecondazione quali la corrente di fecondazione. Con differenti saggi di tossicità abbiamo valutato invece l'effetto dei due biocidi testati sui gameti e sullo sviluppo embrionale.

3. MATERIALI E METODI

3.1 *Sistema modello*

La *Ciona intestinalis* è stata scelta come modello sperimentale per i seguenti motivi:

- La fisiologia e l'embriologia di questo animale sono ampiamente conosciuti e utilizzati alla Stazione Zoologica di Napoli come modello per studi di riproduzione e sviluppo.
- Gli animali sono facilmente reperibili nel golfo di Napoli durante gran parte dell'anno.
- Da un singolo animale si possono ottenere grandi quantità di entrambi i gameti maturi perfettamente sincroni; inoltre gli ovociti sono facili da recuperare ed è possibile rimuovere manualmente le membrane accessorie per applicare tecniche elettrofisiologiche sulla membrana plasmatica nuda.
- Le divisioni cellulari sono sincrone e veloci e lo sviluppo embrionale avviene in tempi brevi.
- È stato sequenziato l'intero genoma, quindi costituisce un buon modello per lo studio delle origini evolutive del *lineage* dei cordati [78,79].
- È considerata l'anello di congiunzione tra invertebrati e vertebrati.

3.2 *Animali e gameti*

Esemplari di *Ciona intestinalis* sono stati prelevati dal golfo di Napoli e stabulati per due giorni in vasche contenenti acqua di mare circolante e sotto luce continua.

Il prelievo dei gameti è stato effettuato previa anestesia degli animali con ghiaccio.

Gli ovociti allo stadio MI sono stati prelevati dall'ovidutto con una pipetta Pasteur, la rimozione delle strutture extracellulari, quali corion e cellule follicolari, è stata eseguita manualmente con sottili aghi di acciaio per le registrazioni elettrofisiologiche.

Per la fecondazione, gli spermatozoi sono stati prelevati con una pipetta Pasteur dallo spermidutto di diversi animali, mischiati, risospesi in acqua di mare filtrata (AMNF) e aggiunti alla piastra di fecondazione ad una concentrazione finale di $10^6/\text{ml}$.

La conta degli spermatozoi è stata effettuata in una camera conta-spermi.

3.3 *Preparazione delle soluzioni*

Il TBT e il diuron (Sigma-Aldrich, Milano, Italia) sono entrambi poco solubili in acqua, per tale motivo si è preparato uno stock iniziale 1M in etanolo per il TBT e 2 mM in dimetilsolfossido (DMSO) per il diuron. Le concentrazioni finali testate sono state ottenute con diluizioni scalari in AMNF come segue: 1 μM , 2 μM , 3 μM , 4 μM , 5 μM e 10 μM .

Preventivamente si è valutata un eventuale tossicità dei solventi etanolo e DMSO su gameti ed embrioni da cui è emerso che la massima concentrazione finale di entrambi i solventi deve essere inferiore allo 0.1% v/v, che rappresenta il valore soglia per questa specie. Esperimenti di controllo sono stati quindi eseguiti in AMNF.

Le concentrazioni testate sono state scelte in quanto già sperimentate su specie di ascidie differenti [80].

3.4 *Whole-cell voltage clamp*

In questo lavoro di tesi tutte le registrazioni elettrofisiologiche sono state effettuate con la tecnica standard del “*whole-cell voltage clamp*” .

3.4.1 *Il set up di elettrofisiologia*

Il *set-up* di elettrofisiologia utilizzato per gli esperimenti eseguiti in questo lavoro di tesi è così costituito (Figura 13):

- Una gabbia di Faraday che fornisce una schermatura dai disturbi elettrici;
- Un tavolo antivibrante che garantisce l’isolamento meccanico;
- Un microscopio ottico rovesciato dotato di un tavolino traslatore dove è posto il vetrino;
- Macromanipolatori e micromanipolatori che consentono di posizionare la pipetta sulla cellula;
- Un amplificatore che consente di rilevare le correnti;
- Un *headstage* facente parte dell’amplificatore in cui viene inserito l’*holder* e che funziona da convertitore voltaggio-corrente;

- Un *holder* in cui è inserita la pipetta di vetro e collegato ad un tubicino di plastica mediante cui è possibile praticare la suzione;
- Una messa a terra collegata all'*headstage* che è posta nel pozzetto;
- Un convertitore analogico-digitale che trasmette i dati al computer.



Figura 13. A) Foto del set up utilizzato per le registrazioni elettrofisiologiche; B) Schematizzazione dei componenti del set up: amplificatore List EP7 (in alto), digitalizzatore Digidata 1322A (Axon Instruments; in basso).

3.4.2 La tecnica del *whole-cell voltage clamp*

La tecnica elettrofisiologica del *patch clamp*, ideata nel 1976 da Erwin Neher e Bert Sakmann poi premi Nobel per la Fisiologia e la Medicina nel 1991, consente di misurare sia le proprietà attive della membrana plasmatica ovvero le correnti ioniche che attraversano i canali localizzati sulla membrana cellulare, sia le proprietà passive quali capacità e conduttanza [81,82].

La tecnica consiste nell'avvicinare alla superficie cellulare una pipetta di vetro e applicare una lieve aspirazione così che il piccolissimo lembo della membrana plasmatica (*patch*) sottostante la punta della pipetta si deformi lievemente ed aderisca ad essa con conseguente formazione di una saldatura (*seal*) ermetica tra di loro. L'adesione è stabile meccanicamente e crea una resistenza elettrica altissima al flusso di corrente, maggiore di 10 gigaOhm ($G\Omega$), tale da presentare una elevata resistenza al passaggio di corrente fuori dalla zona di contatto fra pipetta e membrana [83].

Successivamente mediante una seconda aspirazione, questa volta di intensità maggiore, viene indotta una rottura nel *patch* di membrana all'interno della punta della pipetta, così che l'interno della pipetta diventi un *continuum* con il citoplasma cellulare (Figura 14). Questa configurazione permette di misurare i potenziali elettrici e le correnti ioniche dell'intera cellula ed è perciò chiamato metodo di registrazione "*whole-cell*".

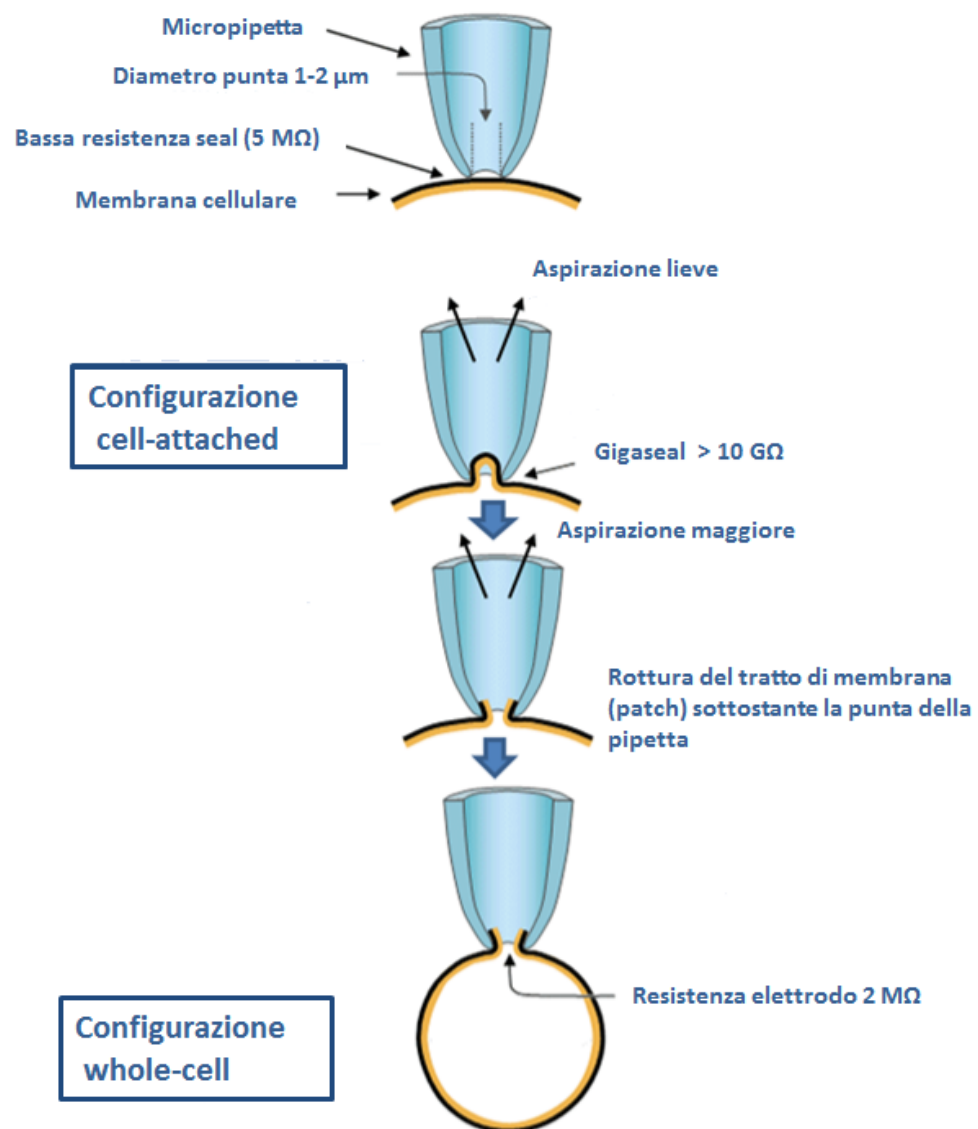


Figura 14. Rappresentazione schematica della tecnica elettrofisiologica “*Whole cell voltage clamp*”.

Le micropipette utilizzate sono caratterizzate da una punta di 1-2 μm di diametro e una resistenza di 2 megaOhm($\text{M}\Omega$) e sono state prodotte a partire da un capillare di vetro borosilicato con filamento (clark elettromedical instruments, UK) mediante un puller (p87, Setter instruments, USA; Figura 15).



Figura 15. Puller p87 (Setter instruments, sinistra) utilizzato per produrre le micropipette (destra) a partire dai capillari di vetro borosilicato

La micropipetta è stata riempita con una soluzione avente composizione simile al citoplasma della cellula costituita da: 200 mM K_2SO_4 , 20 mM NaCl, 200 mM saccarosio, 10 mM EGTA e 10mM Hepes e il pH portato a 7,5. Gli ovociti, dopo la rimozione delle strutture accessorie necessaria per le registrazioni elettrofisiologiche, sono stati posti su vetrini a pozzetto contenenti 200 μ l di AMNF.

In configurazione *whole-cell voltage clamp*, per indurre l'apertura dei canali di sodio voltaggio-dipendenti presenti sulla membrana plasmatica dell'ovocita maturo dell'ascidia *Ciona intestinalis* il potenziale di partenza è stato bloccato mediante amplificatore ad un valore di -80 mV dopodiché sono state applicate delle rampe di voltaggio depolarizzanti comprese tra i valori di potenziale di -70 e +20 mV, con intervallo 10 mV per la durata di 500 millisecondi, così da poter costruire le curve intensità-voltaggio (I/V) (Figura 16).

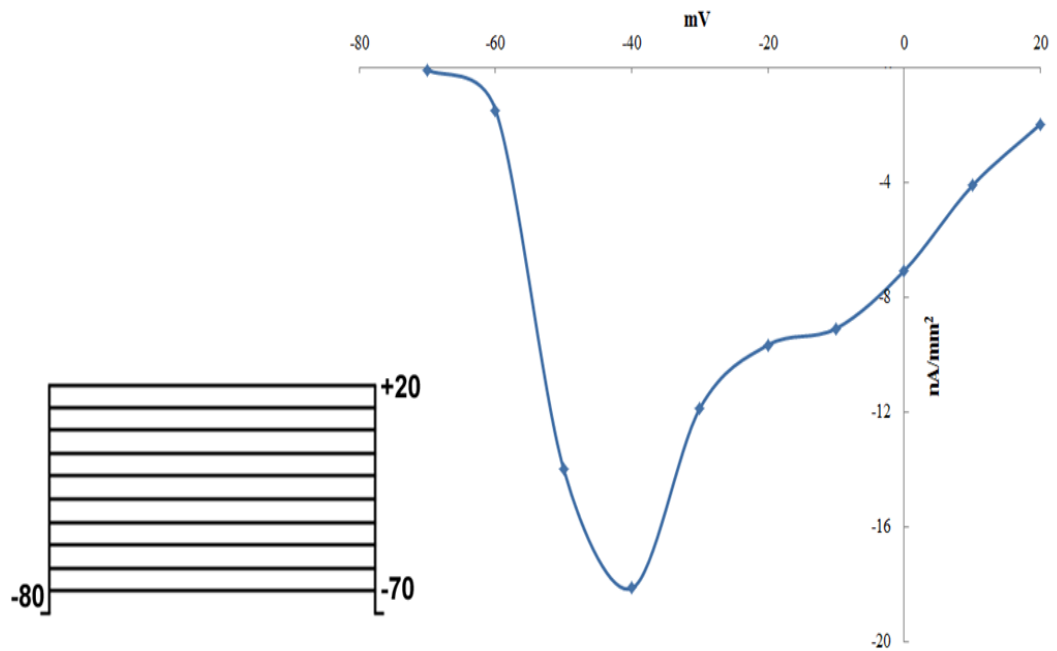


Figura 16. Per indurre l'apertura dei canali di sodio voltaggio-dipendenti si applicano rampe depolarizzanti, a partire da un potenziale di partenza di -80 mV, comprese tra i valori di potenziale di -70 mV ad +20 mV con intervallo di 10 mV (sinistra); curva I/V (destra).

Gli ovociti sono stati poi incubati per 30 minuti con differenti concentrazioni dei due biocidi testati, trascorso il tempo di incubazione sono state ripetute nuovamente le registrazioni elettrofisiologiche.

La tecnica del *whole-cell voltage clamp* permette di visualizzare anche la corrente di fecondazione dell'ovocita. Per tale motivo, durante le registrazioni gli ovociti sono stati fecondati aggiungendo spermatozoi ad una concentrazione finale di 1×10^6 / ml.

L'acquisizione e l'analisi delle correnti è stata effettuata utilizzando il software pClamp 9 (Axon Instruments, USA). L'ampiezza delle correnti riportate sono state normalizzate per l'area della superficie cellulare e quindi espressa in nA/mm²

3.5 Test di tossicità

Per valutare l'effetto del TBT e del diuron sullo sviluppo embrionale abbiamo condotto tre tipi di test di tossicità: spermiotossicità, tossicità sugli ovociti ed embriotossicità.

Per ogni test sono state condotte 20 repliche.

3.5.1 Test di spermiotossicità

Gli spermatozoi sono stati prelevati a secco dallo spermidutto di diversi animali, mescolati, risospesi in acqua di mare e poi aliquotati. Le aliquote sono state incubate per 30 minuti in TBT o diuron ad una concentrazione finale compresa tra 1 e 5 μ M e di 10 μ M, e infine utilizzate per fecondare ovociti non trattati provenienti da un singolo animale.

3.5.2 Test di tossicità sugli ovociti

Aliquote di ovociti, prelevati da uno stesso animale, sono state incubate per 30 minuti con i due biocidi testati a concentrazione finale compresa tra 1 e 5 μM e di 10 μM ; trascorso questo periodo di incubazione gli ovociti sono stati sottoposti a due lavaggi ed infine trasferiti in piastre contenenti AMNF dove sono stati fecondati con spermatozoi non trattati.

3.5.3 Test di embriotossicità

Gli ovociti sono stati prelevati da un singolo animale, trasferiti in piastre contenenti AMNF ed aliquotati. Infine ogni aliquota è stata fecondata in acqua di mare contenente TBT o diuron a concentrazione finale compresa tra 1 e 5 μM e di 10 μM .

3.5.4 Valutazione della percentuale di fecondazione e di larve normomorfe

Dopo 50 minuti dalla fecondazione, abbiamo contato il numero di ovociti che ha subito la prima divisione cellulare (2 blastomeri) e calcolato la percentuale di fecondazione. Le piastre sono state poste in un incubatore, a temperatura di 18°, e il giorno seguente, 24 ore dopo la fecondazione, abbiamo contato il numero di larve normomorfe per valutarne la percentuale.

3.6 *Analisi statistica*

Le differenze tra i valori medi dei risultati ottenuti, sono stati analizzati mediante la procedura dell'analisi della varianza General Linear Model del pacchetto statistico SYSTAT (SAS,1988). Per valori espressi in percentuale, si è proceduto alla normalizzazione dei dati mediante trasformazione in arcoseno. In caso di significatività del modello statistico, si è proceduto con il confronto a coppie delle medie mediante test delle differenze minime significative (Least Significant Differences o LDS). I risultati sono stati espressi come media \pm errore standard ($X \pm ES$).

4. RISULTATI

4.1. *Influenza del TBT e del diuron sulla conduttanza della membrana plasmatica*

Bloccando il potenziale di partenza degli ovociti al valore di -80 mV abbiamo calcolato la conduttanza come media dei valori registrati nel *range* di potenziale compreso tra -70 e -40 mV.

In ovociti di controllo il valore medio di conduttanza registrato è di $203,04 \pm 20,40$ nS/mm² (n= 25). In ovociti incubati per 30 minuti in TBT alle concentrazioni comprese tra 1 e 5 μ M e di 10 μ M abbiamo osservato un aumento significativo della conduttanza rispetto al controllo (rispettivamente $276,09 \pm 26,41$ nS/mm²; $345,46 \pm 17,08$ nS/mm²; $341,80 \pm 23,87$ nS/mm²; $369,49 \pm 18,32$ nS/mm²; $330,21 \pm 18,97$ nS/mm²; $357,22 \pm 21,40$ nS/mm²; n= 25; P<0,01).

In seguito all'incubazione in diuron alle concentrazioni comprese tra 1 e 3 μ M non abbiamo osservato variazioni significative della conduttanza rispetto al controllo (controllo $168,42 \pm 14,2$ nS/mm²; $170,2 \pm 12,4$ nS/mm²; $190,5 \pm 11,2$ nS/mm²; $191,3 \pm 13,1$ nS/mm²; n= 28). È stato invece registrato un incremento significativo della conduttanza a partire dalla concentrazione di 4 μ M, che aumenta ulteriormente alla concentrazione di 5 μ M da cui poi raggiunge una fase di *plateau* (rispettivamente $233,7 \pm 15,3$ nS/mm²; $295,5 \pm 16,2$ nS/mm²; $298,7 \pm 14,8$ nS/mm²; n= 28; P<0,01).

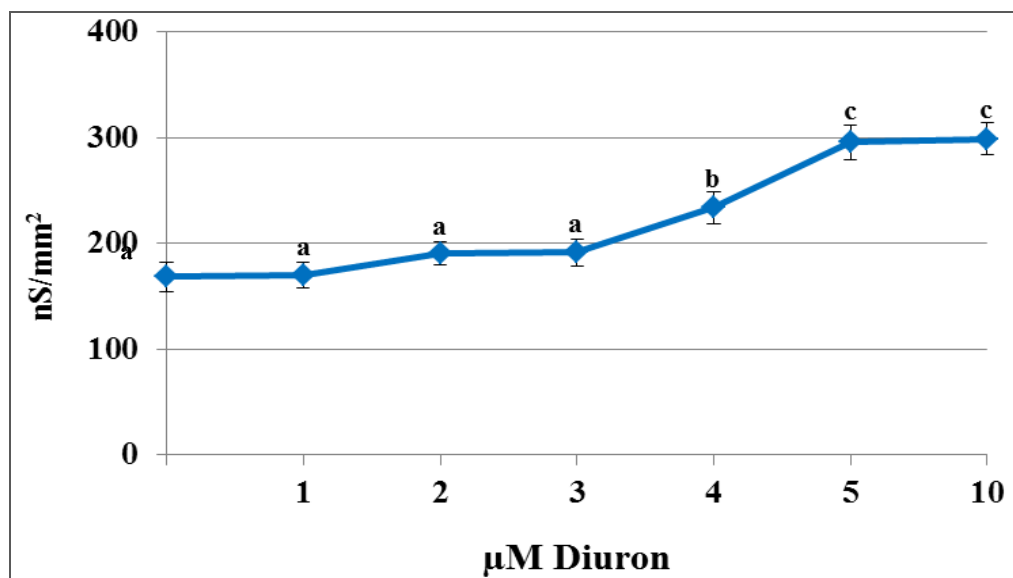
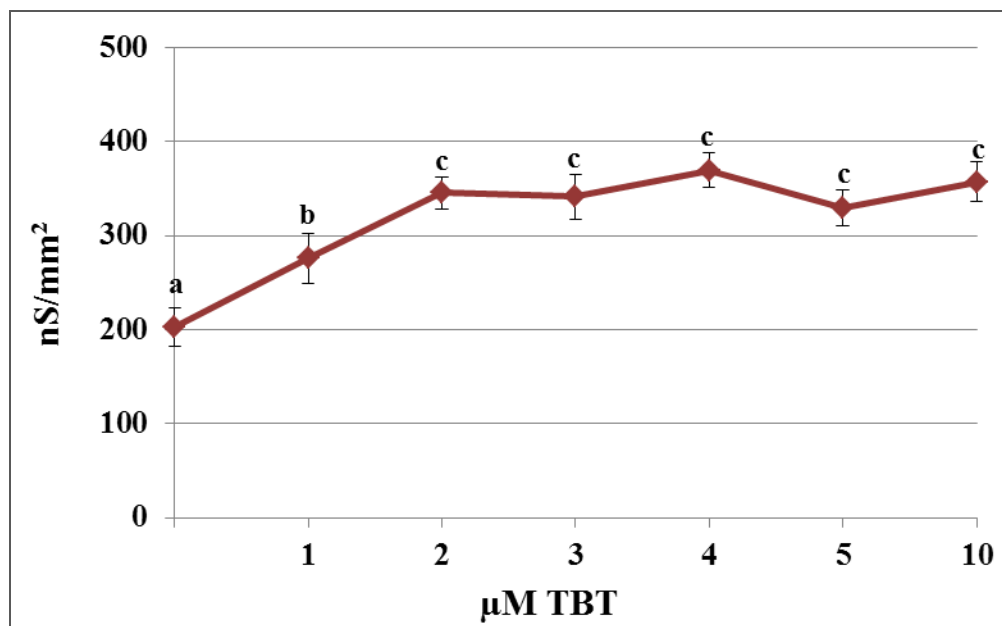


Figura 17. Valori di conduttanza della membrana plasmatica al potenziale di partenza di -80 mV; prima e dopo incubazione con differenti concentrazioni di TBT (grafico superiore) e di diuron (grafico inferiore); a vs b vs c $P < 0,01$.

4.2. Influenza del TBT e del diuron sulle correnti di sodio

Le curve I-V ottenute da ovociti incubati in differenti concentrazioni di TBT e a cui poi sono state applicate rampe di voltaggio depolarizzanti comprese tra il valore di potenziale di -70 e +20 mV hanno mostrato che questo composto riduce in maniera dose dipendente a partire dalla concentrazione di 2 μ M l'ampiezza delle correnti di sodio la cui massima attivazione si verifica al valore di potenziale di -40 mV. In particolare, negli ovociti non trattati l'ampiezza delle correnti di sodio al valore di picco è pari a $20,14 \pm 0,3$ nA/mm² e non varia significativamente alla concentrazione di 1 μ M ($18,73 \pm 0,5$ nA/mm²; n=25). A partire dalla concentrazione di 2 μ M l'ampiezza di queste correnti diminuisce progressivamente come segue: $15,76 \pm 0,2$ nA/mm²; $15,46 \pm 0,4$ nA/mm²; $16,13 \pm 0,4$ nA/mm²; $12,14 \pm 0,6$ nA/mm²; $12,26 \pm 0,5$ nA/mm²; n= 25; P<0,01 (Figura 18).

Andando a valutare la percentuale di riduzione dell'ampiezza delle correnti di sodio indotta dal TBT abbiamo osservato che alla concentrazione di 1 μ M la riduzione è del 7 ± 1 %, aumenta ulteriormente alle concentrazioni comprese tra 2 e 4 μ M (rispettivamente 22 ± 2 %; $23 \pm 2,1$ % e $21 \pm 2,2$ % n=25; P<0,01) fino a raggiungere la massima riduzione alle concentrazioni di 5 e 10 μ M (rispettivamente $40 \pm 1,8$ % e $39 \pm 1,5$ % n=25; P<0,01) (Figura 19).

Analogamente anche il diuron induce una riduzione significativa delle correnti di sodio in modo dose dipendente a partire dalla concentrazione di 2 μ M. Negli ovociti non trattati, le correnti di sodio registrate presentano un' ampiezza di $17,80 \pm 0,2$ nA/mm² simile all'ampiezza delle correnti registrate in ovociti incubati in 1 μ M di diuron ($17,09 \pm 0,6$ nA/mm²; n=28). L'ampiezza delle correnti di sodio registrate in ovociti incubati in diuron alla concentrazione di 2 μ M e 3 μ M non differiscono tra di loro ma risulta

diminuita significativamente rispetto al controllo (rispettivamente $10,74 \pm 0,4 \text{ nA/mm}^2$ e $11,28 \pm 0,2 \text{ nA/mm}^2$; $n=28$; $P<0,01$). Con l'aumento della concentrazione di diuron ($3 \mu\text{M}$) si osserva un'ulteriore riduzione dell'ampiezza delle correnti di sodio ($6,71 \pm 0,5 \text{ nA/mm}^2$; $n=28$; $P<0,01$) che raggiunge la massima riduzione pari a $4,21 \pm 0,3 \text{ nA/mm}^2$ ($n=28$; $P<0,01$) alla concentrazione di $5 \mu\text{M}$, dopo infatti questo valore si raggiunge una fase di *plateau* ($4,2 \pm 0,5 \text{ nA/mm}^2$ alla concentrazione di $10 \mu\text{M}$; $n=28$; $P<0,01$) (Figura 20).

Valutando la percentuale di riduzione dell'ampiezza delle correnti di sodio indotta dal diuron osserviamo che, diversamente dal TBT, in questo caso la percentuale di riduzione è molto più alta. Infatti, alla concentrazione di $1 \mu\text{M}$ è pari a $3 \pm 0,9 \%$, aumenta ulteriormente alle concentrazioni comprese di $2 \mu\text{M}$ e $3 \mu\text{M}$ (rispettivamente $22 \pm 2,1 \%$ e $23 \pm 2,4$; $P<0,01$), raggiunge il valore di $62 \pm 1,9 \%$ alla concentrazione di $4 \mu\text{M}$ fino ad un valore massimo rispettivamente di $76 \pm 2 \%$ e $76 \pm 2,2 \%$ alle concentrazioni di $5 \mu\text{M}$ e $10 \mu\text{M}$ (Figura 21).

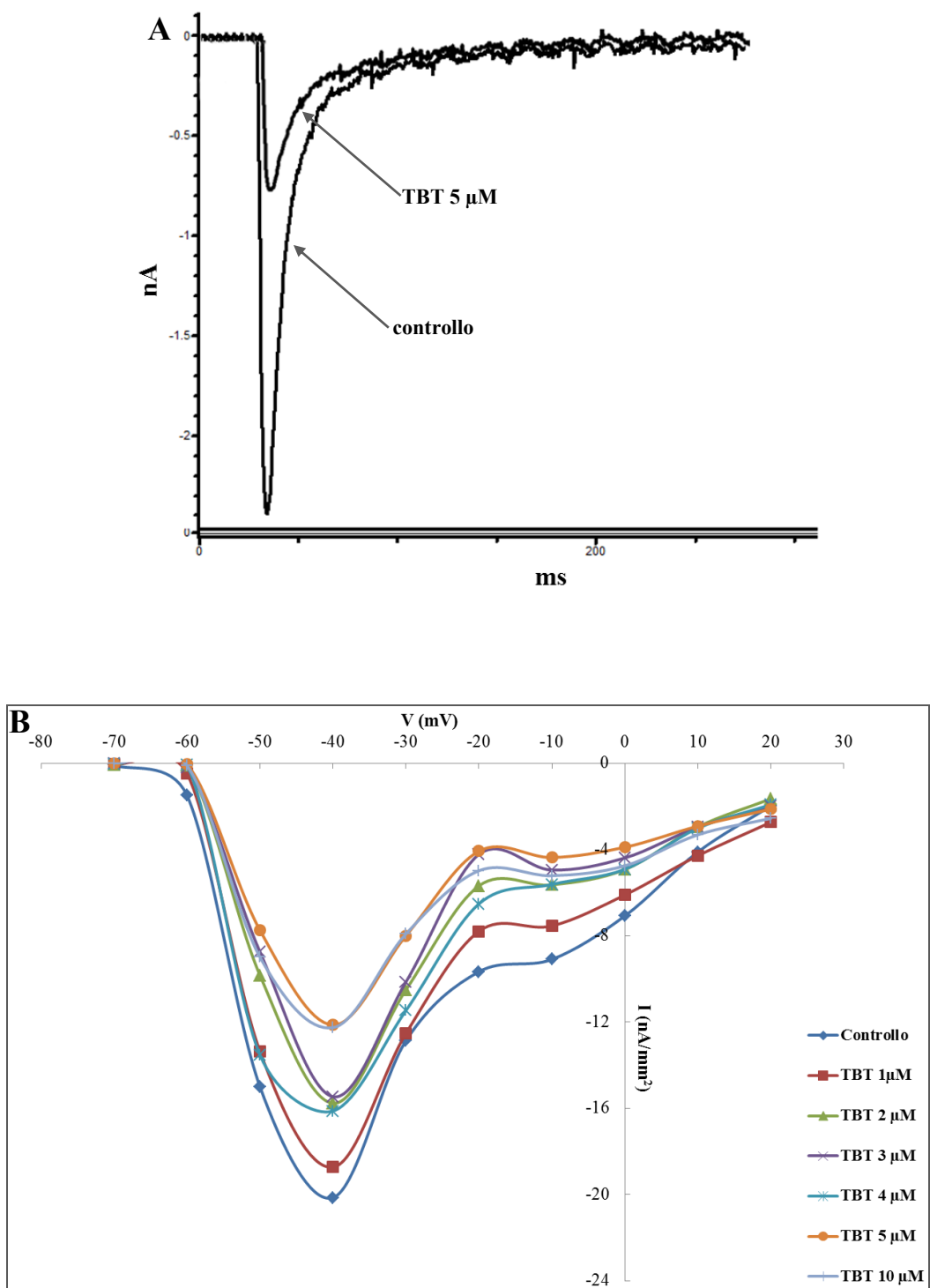


Figura 18. A) Tracce delle correnti di sodio registrate al valore di potenziale di -40 mV, con il potenziale di partenza bloccato al valore di -80 mV, in ovociti di controllo e incubati in TBT 5 μM . B) Curve I-V ottenute da ovociti, incubati e non in differenti concentrazioni di TBT, il cui potenziale di partenza è stato bloccato al valore di -80 mV a cui sono state poi applicate rampe di voltaggio depolarizzanti comprese tra i valori di potenziale di -70 a +20 mV con intervallo di 10 mV. Le barre di errore sono state omesse per la chiarezza dell'immagine.

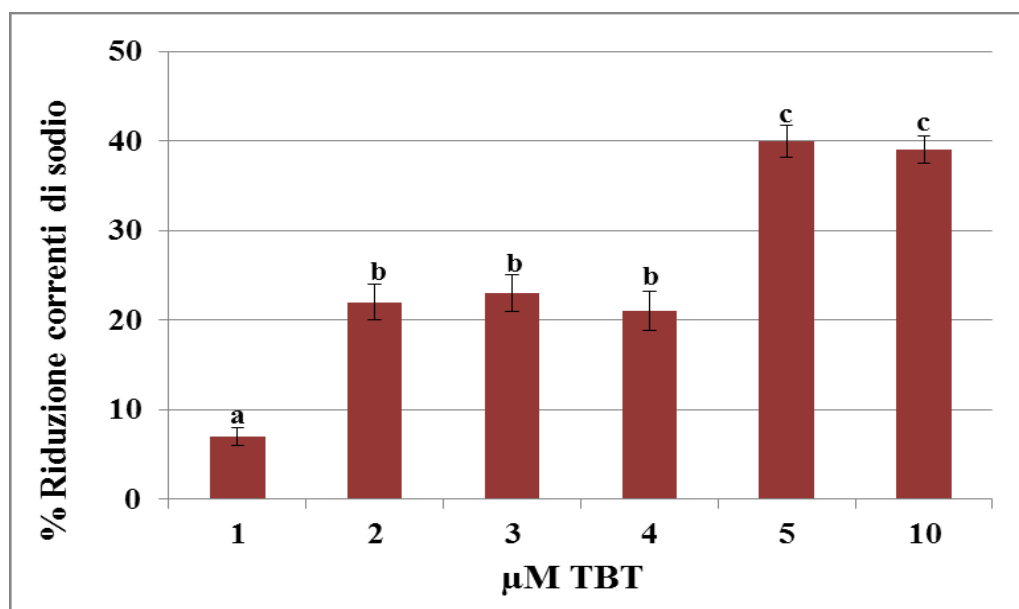


Figura 19. Percentuale di riduzione dell'ampiezza delle correnti di sodio dopo incubazione degli ovociti, per 30 minuti, in differenti concentrazioni di TBT. a vs b vs c $P < 0,01$.

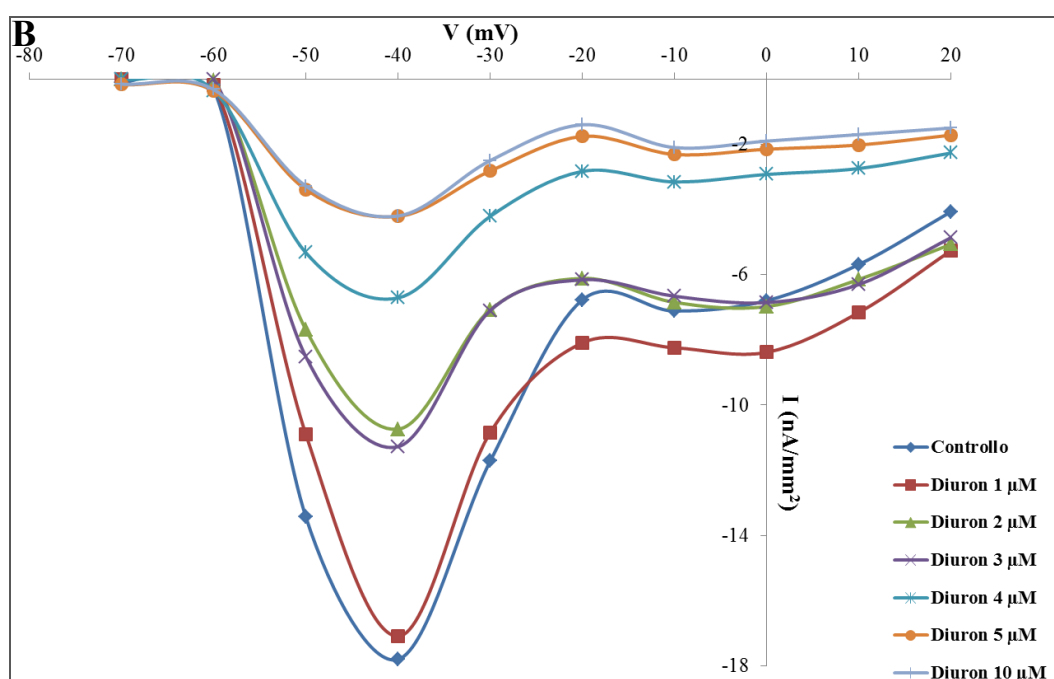
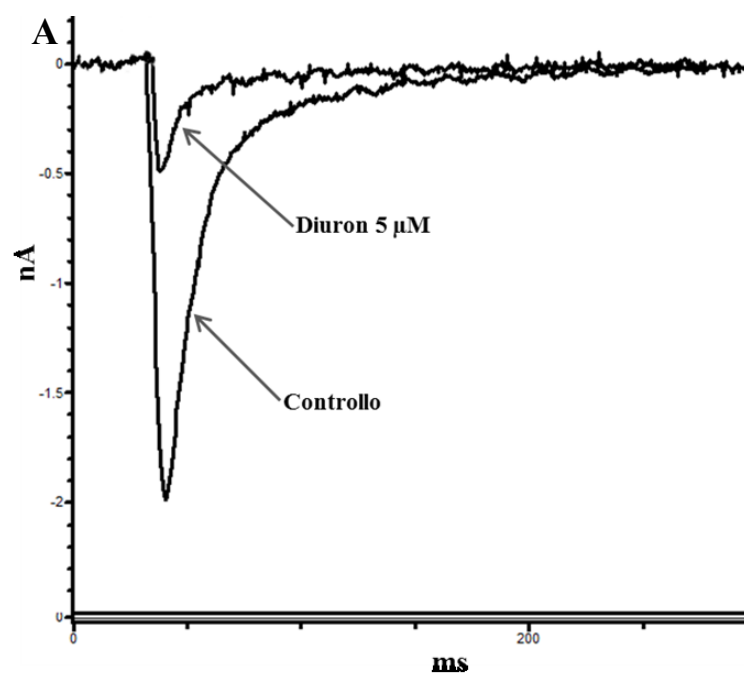


Figura 20. A) Tracce delle correnti di sodio registrate al valore di potenziale di -40 mV, con il potenziale di partenza bloccato al valore di -80 mV, in ovociti di controllo e incubati in diuron 5 μM . B) Curve I-V ottenute da ovociti, incubati e non in differenti concentrazioni di diuron, il cui potenziale di partenza è stato bloccato al valore di -80 mV a cui sono state poi applicate rampe di voltaggio depolarizzanti comprese tra i valori di potenziale di -70 a +20 mV con intervallo di 10 mV. Le barre di errore sono state omesse per la chiarezza dell'immagine.

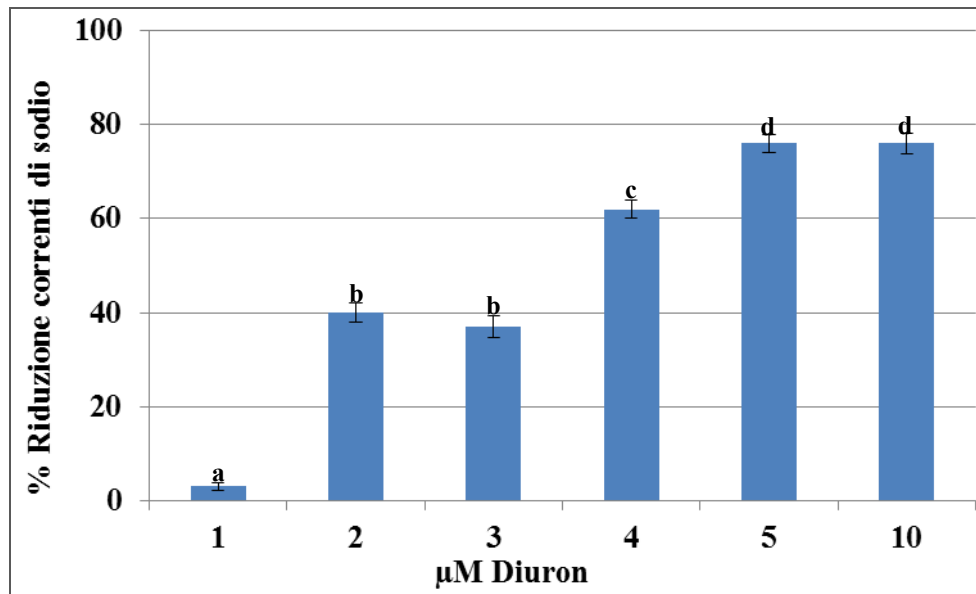


Figura 21. Percentuale di riduzione dell'ampiezza delle correnti di sodio dopo l'incubazione per 30 minuti in differenti concentrazioni di diuron. a vs b vs c $P < 0,01$.

4.3 Influenza del TBT e del diuron sulle costanti di tempo dei canali di sodio voltaggio-dipendenti

I canali di sodio voltaggio-dipendenti sono caratterizzati da tre tipi di stadi: chiuso, aperto e inattivo. Al potenziale di riposo i canali sono nello stadio chiuso, la depolarizzazione della membrana plasmatica induce la transizione dallo stadio chiuso a quello aperto determinando l'ingresso di ioni sodio che depolarizzano la membrana plasmatica. Questa depolarizzazione induce il passaggio allo stadio inattivo che si verifica allo stesso valore di potenziale di membrana a cui avviene l'apertura. I canali rimangono nello stadio inattivo finché il potenziale di membrana ritorna ai valori di riposo grazie alla fuoriuscita degli ioni potassio, a questo punto il canale ritorna nello stato chiuso.

Negli ovociti maturi dell'ascidia *Ciona intestinalis* i canali di sodio sono attivati al valore massimo di potenziale di -40 mV. In questo lavoro di tesi le costanti di tempo (τ), quali di attivazione e di inattivazione, sono state calcolate a questo valore di potenziale.

In ovociti di controllo, non trattati, le correnti di sodio raggiungono il picco massimo in $0,98 \pm 0,06$ ms ($n=25$). Dopo incubazione degli ovociti in TBT alle concentrazioni comprese tra 1 e 5 μ M e di 10 μ M non si osserva alcuna variazione significativa rispetto al controllo della cinetica di attivazione del canale (rispettivamente $1,09 \pm 0,05$ ms; $1,08 \pm 0,05$ ms; $1,15 \pm 0,07$ ms; $1,04 \pm 0,04$ ms; $1,1 \pm 0,06$ ms; $1,4 \pm 0,04$ ms; $n=25$) (Figura 22 grafico superiore). Il TBT invece influenza la costante di inattivazione dei canali di sodio a partire dalla concentrazione di 2 μ M. Infatti in ovociti di controllo e incubati in TBT alla concentrazione di 1 μ M l'inattivazione si verifica ad uno stesso valore di tempo (rispettivamente $20,68 \pm 1,2$ ms e $18,61 \pm 1,2$ ms; $n=25$). Alle concentrazioni comprese tra 2 e 5 μ M e di 10 μ M si osserva che il canale di sodio si inattiva più

velocemente (rispettivamente $16,2 \pm 0,9$ ms; $16,52 \pm 1,2$ ms; $16,4 \pm 1,1$ ms; $16,17 \pm 1$ ms e $15,15 \pm 1,1$ ms; $n=25$; $P<0,01$) rispetto al controllo (Figura 22, grafico inferiore).

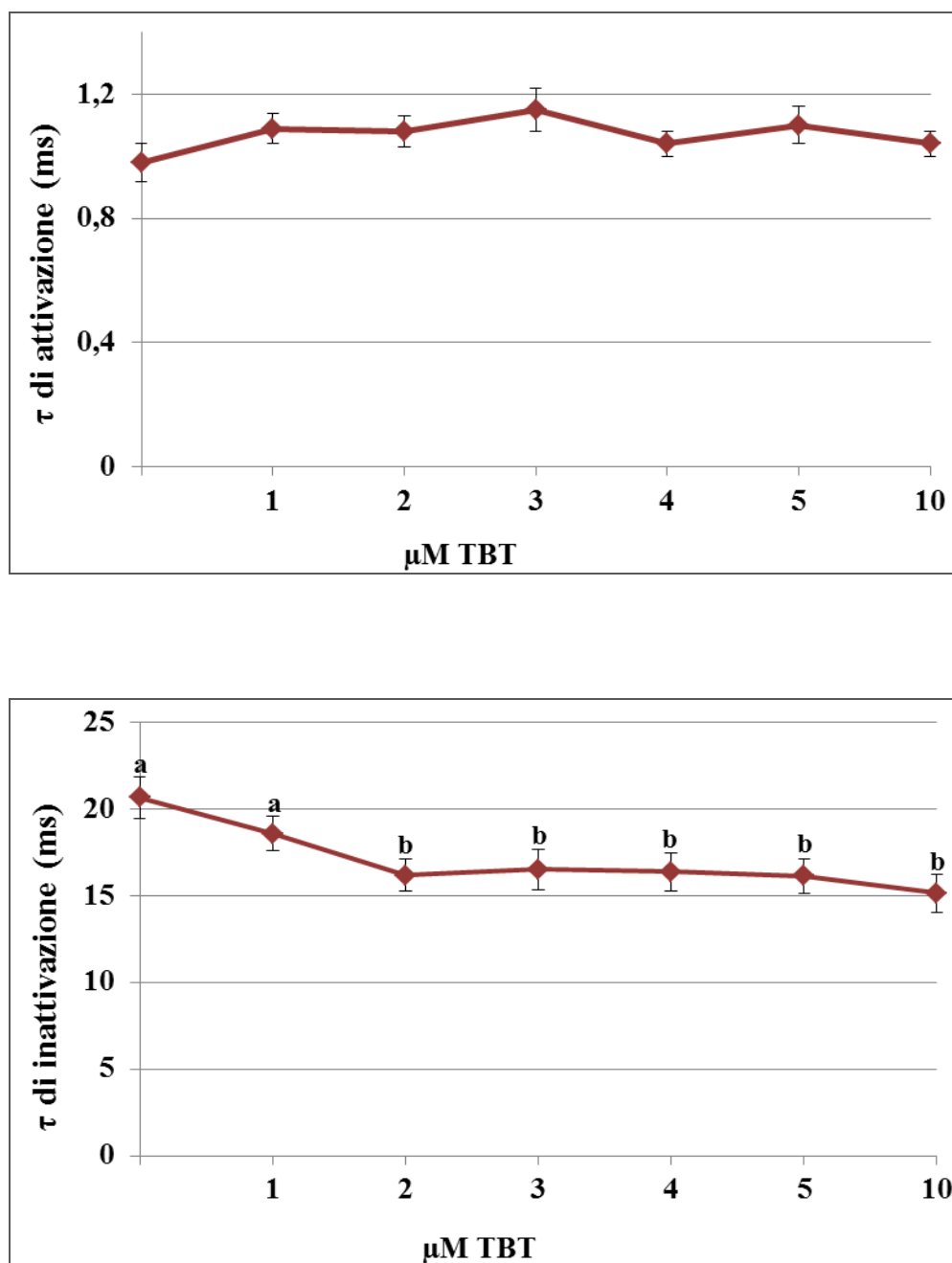


Figura 22. Valori della costante di attivazione (grafico superiore) e di inattivazione (grafico inferiore) calcolate al valore di potenziale di -40 mV in ovociti incubati e non in differenti concentrazioni di TBT. a vs b $P<0,01$.

Analogamente al TBT anche il diuron non influenza significativamente la costante di attivazione del canale di sodio voltaggio-dipendente mentre ha un effetto sulla sua cinetica di inattivazione.

Infatti, in ovociti di controllo le correnti di sodio raggiungono il picco massimo in $1,12 \pm 0,05$ ms (n=28). Dopo incubazione degli ovociti in diuron alle concentrazioni comprese tra 1 e 5 μ M e di 10 μ M la cinetica di attivazione del canale non varia rispetto al controllo (rispettivamente $1,2 \pm 0,04$ ms; $1,1 \pm 0,05$ ms; $1,11 \pm 0,06$ ms; $1,19 \pm 0,07$ ms; $1,15 \pm 0,07$ ms; $1,2 \pm 0,05$ ms; n=28) (Figura 23, grafico superiore).

In ovociti di controllo e incubati in diuron alla concentrazione di 1 μ M l'inattivazione del canale di sodio si verifica ad uno stesso valore di tempo (rispettivamente $20,53 \pm 1$ ms e $19,2 \pm 1,3$ ms; n=28). Alle concentrazioni comprese tra 2 e 5 μ M e di 10 μ M si osserva che il canale di sodio si inattiva più velocemente (rispettivamente $13,98 \pm 1,2$ ms; $13,5 \pm 1$ ms; $13,96 \pm 1,1$ ms; $12,95 \pm 1,3$ ms e $12,8 \pm 0,9$ ms; n=28; $P < 0,01$) rispetto al controllo (Figura 23, grafico inferiore).

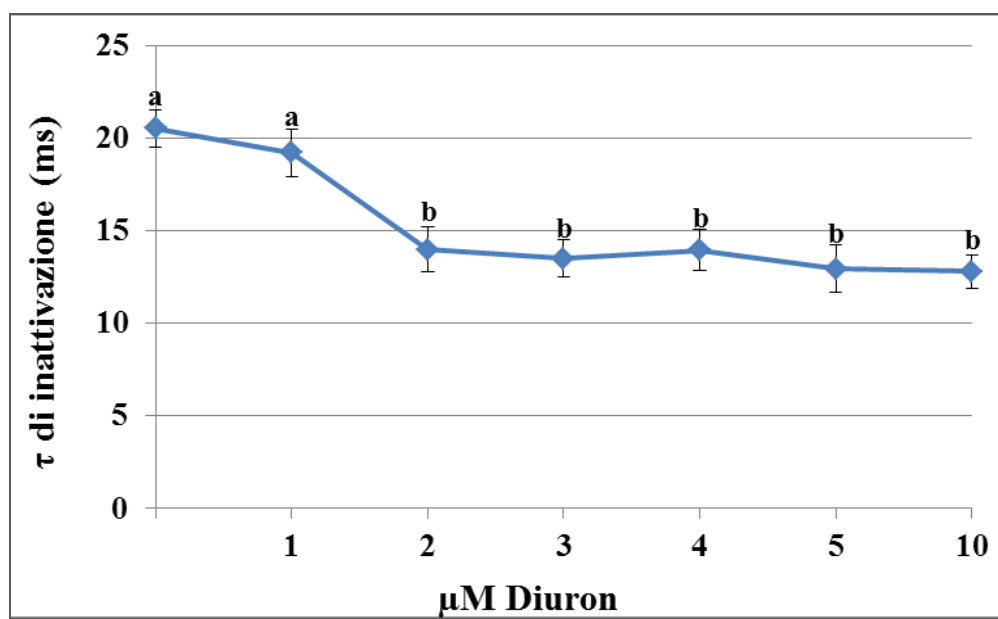
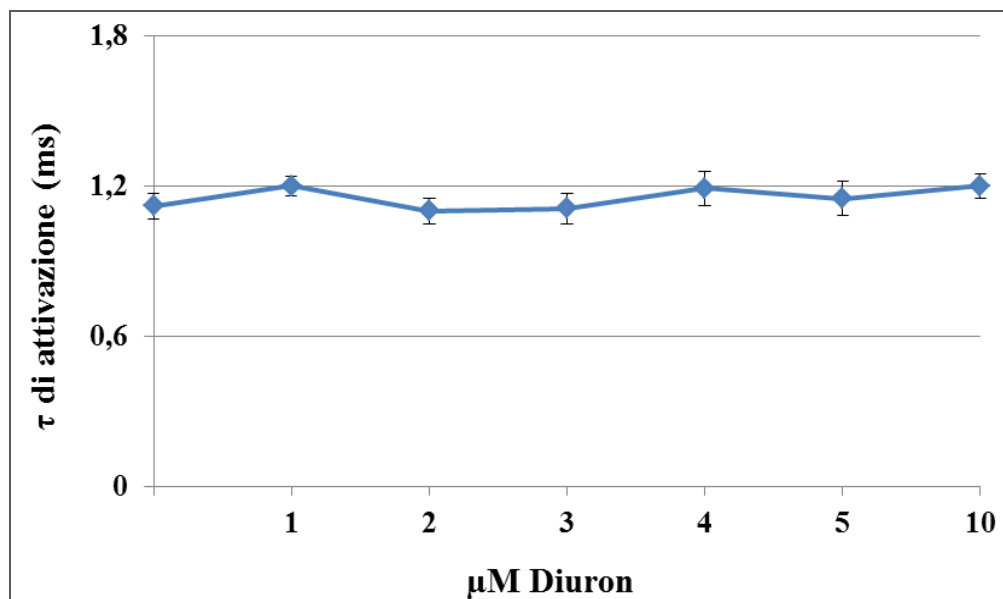


Figura 23. Valori della costante di attivazione (grafico superiore) e di inattivazione (grafico inferiore) calcolate al valore di potenziale di -40 mV in ovociti incubati e non in differenti concentrazioni di diuron. a vs b $P < 0,01$.

4.3. Influenza del TBT e del diuron sulla corrente di fecondazione

Ovociti di controllo in fase MI, con il potenziale di partenza bloccato al valore di -80 mV, sono stati fecondati in AMNF con spermatozoi prelevati da vari animali. L'interazione con lo spermatozoo fecondante dà vita a una corrente di fecondazione di ampiezza pari a $1472,80 \pm 130,93$ pA, $n=15$; seguita dalla contrazione del corpo cellulare (Figura 24).

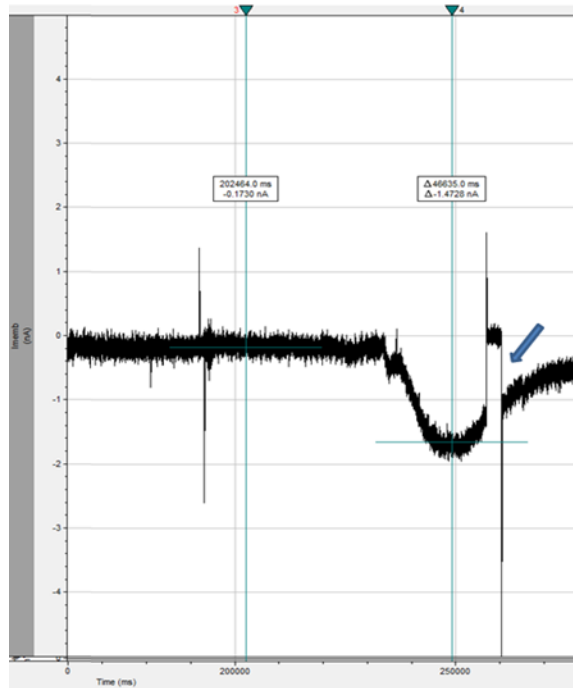


Figura 24. Corrente di fecondazione al potenziale di partenza di -80 mV generata da ovociti non trattati. La freccia indica un'interruzione della lettura eseguita per registrare il potenziale di fecondazione.

In seguito all'incubazione in TBT, a tutte le concentrazioni testate, si osserva una riduzione significativa ($n= 25$; $P<0,01$) e progressiva rispetto al controllo della percentuale di ovociti che dà origine alla corrente di fecondazione. In assenza di incubazione, il $98 \pm 2 \%$ degli ovociti dà vita alla corrente di fecondazione, alla concentrazione di $1 \mu\text{M}$ è generata dal $71 \pm 2,3 \%$ degli ovociti. Tale percentuale diminuisce ulteriormente ad un valore di $57 \pm 2,6 \%$ dopo incubazione in $2 \mu\text{M}$ di TBT e raggiunge un valore massimo di $33 \pm 2,7 \%$ alla concentrazione di $3 \mu\text{M}$, aumentando ulteriormente la concentrazione infatti non si osserva un riduzione significativa, rispetto al suddetto valore, delle percentuale di ovociti che danno vita alla corrente di fecondazione ($34 \pm 3,1 \%$ in $4 \mu\text{M}$ diuron; $32 \pm 3,5 \%$ in $5 \mu\text{M}$ diuron e $35 \pm 3 \%$ in $10 \mu\text{M}$ diuron) (Figura 25).

Inoltre nei casi in cui la corrente di fecondazione è generata, la sua ampiezza risulta inferiore rispetto al controllo ($P<0,01$) ed è simile a tutte le concentrazioni di TBT testate (Tabella 1 e Figura 25).

Tutte le correnti di fecondazione sono seguite dalla contrazione del corpo cellulare.

Concentrazione di TBT	Ampiezza della corrente di fecondazione ($\text{pA} \pm \text{ES}$)
$1 \mu\text{M}$	$664 \pm 50,4$
$2 \mu\text{M}$	$669,37 \pm 76,8$
$3 \mu\text{M}$	$771,42 \pm 69,59$
$4 \mu\text{M}$	$621,62 \pm 74,89$
$5 \mu\text{M}$	$561,7 \pm 61,14$
$10 \mu\text{M}$	$682,16 \pm 61,13$

Tabella 1. Valori dell'ampiezza delle correnti di fecondazione, riportati in picoAmpere (pA), generate da ovociti incubati per 30 minuti in differenti concentrazioni di TBT.

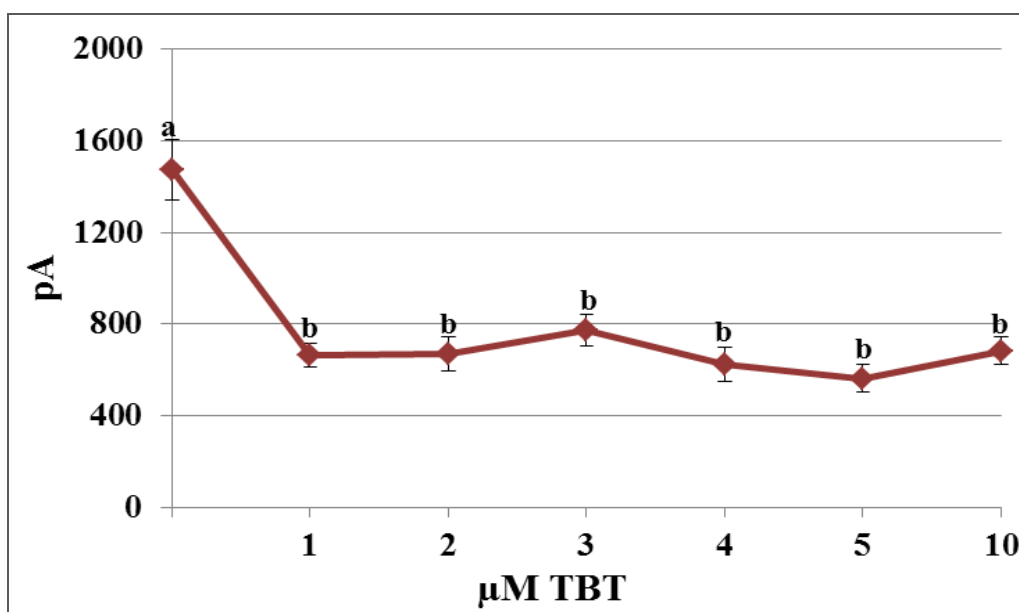
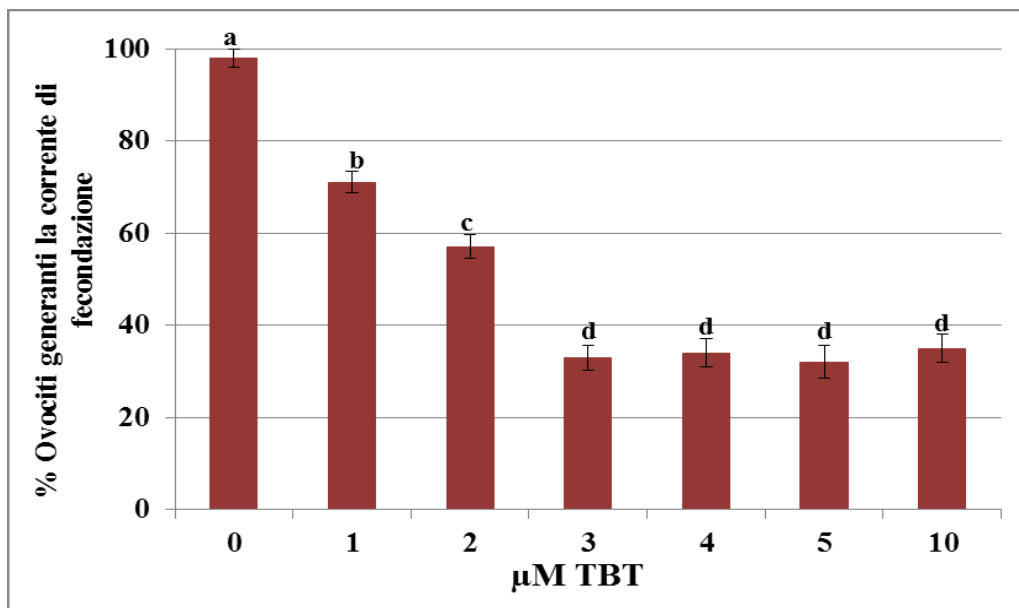


Figura 25. Grafico superiore: percentuale di ovociti che danno origine alla corrente di fecondazione prima e dopo incubazione in differenti concentrazioni di TBT. a vs b vs c vs d $P < 0,01$. Grafico inferiore: riduzione dell'ampiezza della corrente di fecondazione dopo incubazione in differenti concentrazioni di TBT. a vs b $P < 0,01$.

Diversamente dal TBT, in seguito all'incubazione in diuron, a tutte le concentrazioni testate, non si osserva un'alterazioni significativa rispetto al controllo della percentuale di ovociti che dà origine alla corrente di fecondazione (controllo $98 \pm 1,8 \%$; diuron 1 μM $99 \pm 0,9 \%$; diuron 2 μM $97,8 \pm 2 \%$; diuron 3 μM $98,5 \pm 1,2 \%$; diuron 4 μM $99,1 \pm 0,8 \%$; diuron 5 μM $98,3 \pm 1,6 \%$ e diuron 10 μM $98,7 \pm 1,0 \%$; $n = 28$; Figura 26, grafico superiore). Inoltre anche l'ampiezza della corrente di fecondazione (Tabella 2 e Figura 26, grafico inferiore) e la contrazione cellulare che la seguono risultano inalterate.

Concentrazione diuron	Ampiezza della corrente di fecondazione (pA \pm ES)
1 μM	$1400 \pm 67,8$
2 μM	$1492,86 \pm 83,1$
3 μM	$1437,5 \pm 87,5$
4 μM	$1387,5 \pm 55,9$
5 μM	$1367,5 \pm 76,8$
10 μM	$1402,6 \pm 68,4$

Tabella 2. Valori dell'ampiezza delle correnti di fecondazioni, riportate in picoAmpere (pA), ottenute da ovociti incubati in differenti concentrazioni di diuron.

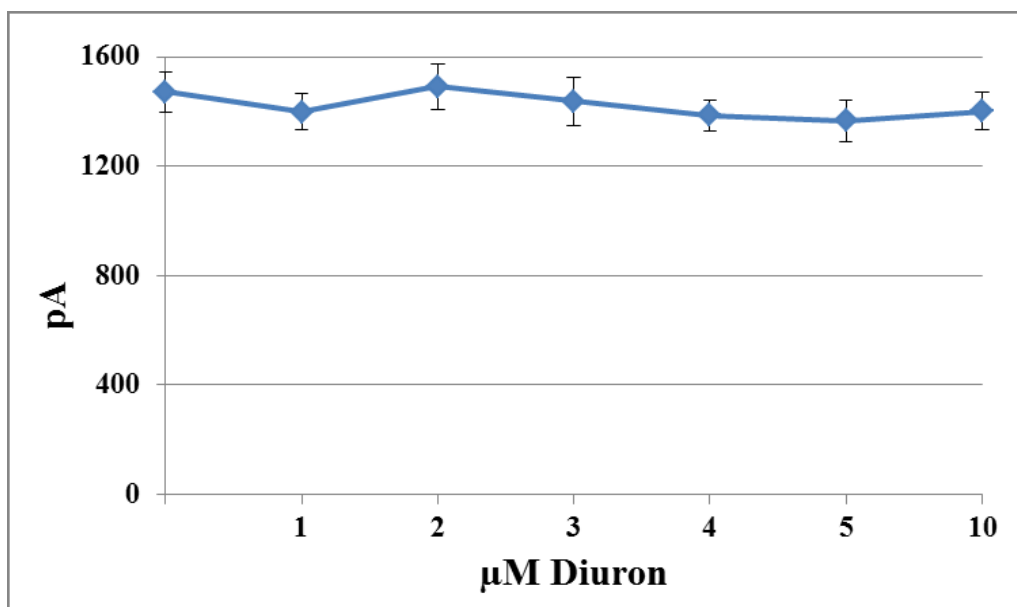
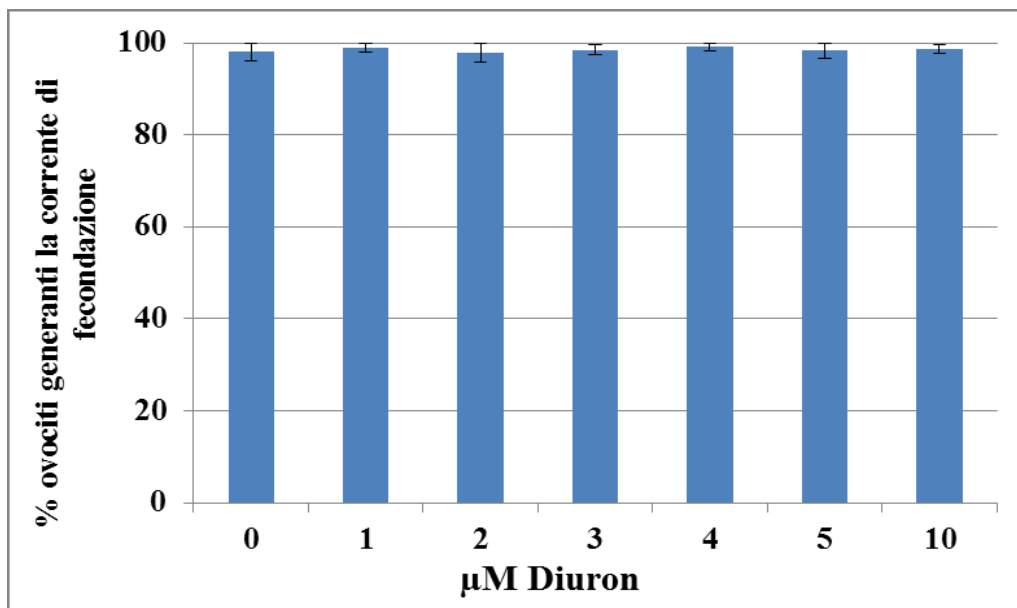


Figura 26. Grafico superiore: percentuale di ovociti che danno origine alla corrente di fecondazione prima e dopo incubazione in differenti concentrazioni di diuron. Grafico inferiore: ampiezza della corrente di fecondazione che resta invariata in seguito all'incubazione in differenti concentrazioni in diuron.

4.5 Test di tossicità

4.5.1 Test di spermiotossicità

Il TBT e il diuron alle differenti concentrazioni testate non alterano le capacità fecondanti dello spermatozoo. Infatti in entrambi i casi la percentuale di fecondazione, calcolata da ovociti fecondati con spermatozoi incubati con i due biocidi testati a concentrazioni comprese tra 1 μM e 5 μM e di 10 μM , non varia in maniera significativa rispetto al controllo. Inoltre la percentuale di larve con normale morfologia che si sviluppano da questi embrioni risulta non significativamente differente dalla percentuale di larve normomorfe ottenuta da ovociti fecondati con spermatozoi non trattati (Tabella 3 e Figura 27, tabella 4 e Figura 28).

Concentrazione TBT	Percentuale di fecondazione \pm ES	Percentuale di larve normomorfe \pm ES
Controllo	98,0 \pm 1	81,17 \pm 2,2
1 μ M	98,83 \pm 1,2	82,5 \pm 3
2 μ M	96,2 \pm 2,2	80,5 \pm 2,7
3 μ M	96,0 \pm 2,5	80,75 \pm 2,5
4 μ M	96,2 \pm 2,6	79,8 \pm 1,9
5 μ M	95,8 \pm 2,3	80,5 \pm 2,1
10 μ M	98,5 \pm 1,4	83 \pm 2

Tabella 3. Valori delle percentuali di fecondazione e di larve normomorfe ottenuti dalla fecondazione di ovociti con spermatozoi incubati, per 30 minuti, in differenti concentrazioni di TBT.

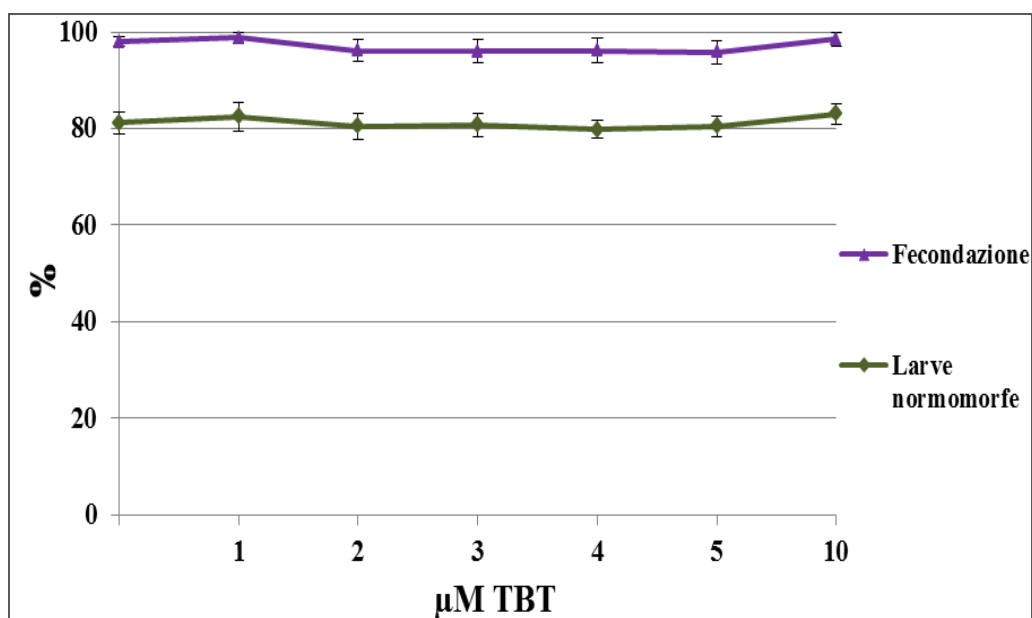


Figura 27. Percentuale di fecondazione e di larve normomorfe ottenute fecondando ovociti con spermatozoi incubati, per 30 minuti, in differenti concentrazioni di TBT.

Concentrazione diuron	Percentuale di fecondazione \pm ES	Percentuale di larve normomorfe \pm ES
Controllo	98 ± 1	$87,43 \pm 1,3$
1 μ M	$96,5 \pm 1,6$	$87,6 \pm 1,5$
2 μ M	97 ± 2	$88 \pm 1,4$
3 μ M	$96,8 \pm 1,8$	$87,5 \pm 1,7$
4 μ M	$95 \pm 1,9$	$86 \pm 1,1$
5 μ M	$96,7 \pm 1,6$	$87,6 \pm 1,9$
10 μ M	$98 \pm 1,6$	$88,5 \pm 1,8$

Tabella 4. Valori delle percentuali di fecondazione e di larve normomorfe ottenuti dalla fecondazione di ovociti con spermatozoi incubati in differenti concentrazioni di diuron.

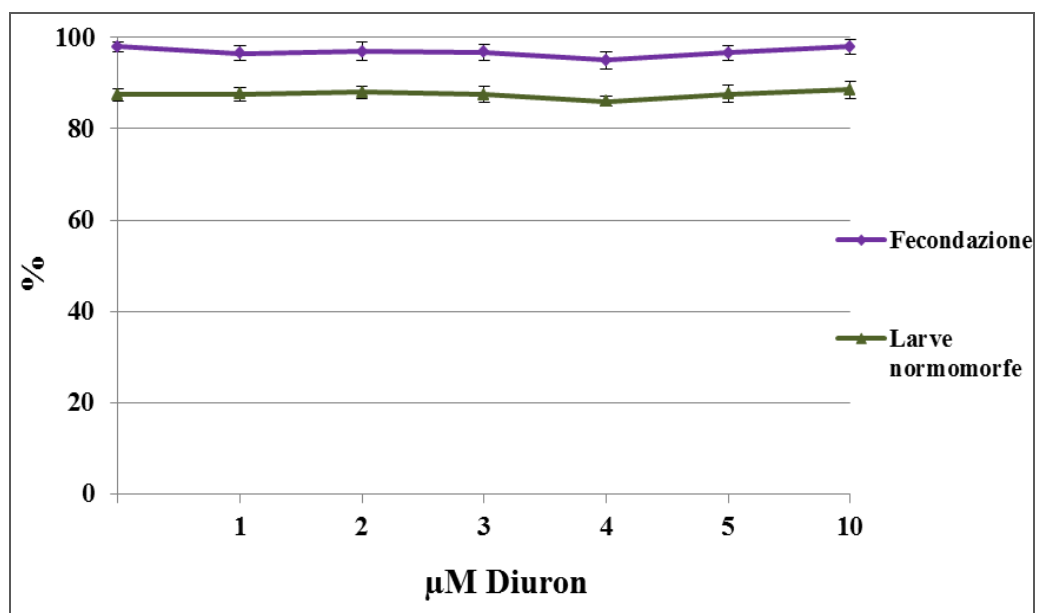


Figura 28. Percentuale di fecondazione e di larve normomorfe ottenute fecondando ovociti con spermatozoi incubati in differenti concentrazioni di diuron.

4.5.2 Tossicità sugli ovociti

La percentuale di fecondazione calcolata da ovociti incubati in concentrazioni di TBT o diuron comprese tra 1 μM e 5 μM e di 10 μM , lavati e poi fecondati non risulta significativamente differente da quella calcolata da ovociti di controllo non trattati. Inoltre anche la percentuale di larve mobili e con normale morfologia sviluppatesi da questi embrioni non differisce in modo significativo dal controllo (Tabella 5 e Figura 29, tabella 6 e Figura 30).

Concentrazione TBT	Percentuale di fecondazione \pm ES	Percentuale di larve normomorfe \pm ES
Controllo	99,31 \pm 1,5	88,07 \pm 1,8
1 μ M	98,85 \pm 1,1	87,85 \pm 2,6
2 μ M	98,61 \pm 1,2	85,15 \pm 2,3
3 μ M	98,85 \pm 1,1	86,77 \pm 2,0
4 μ M	98,15 \pm 2	88,38 \pm 1,9
5 μ M	99,23 \pm 1,0	87,38 \pm 2,2
10 μ M	98,15 \pm 1,2	86,31 \pm 2,6

Tabella 5. Valori delle percentuali di fecondazione e di lave normomorfe ottenuti dalla fecondazione di ovociti incubati in differenti concentrazioni di TBT.

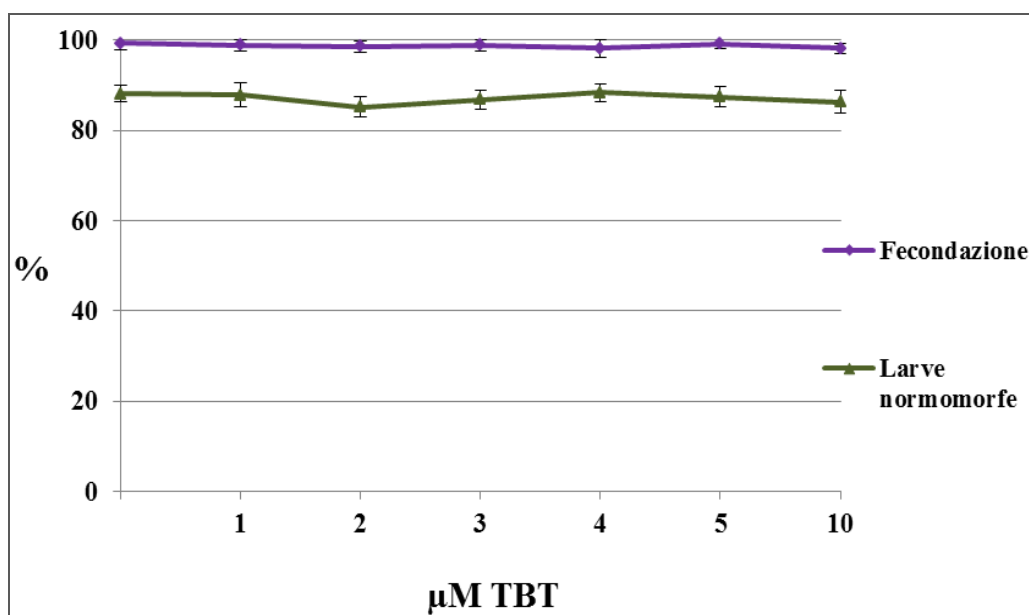


Figura 29. Percentuale di fecondazione e di larve normomorfe ottenute fecondando ovociti incubati in differenti concentrazioni di TBT e poi lavati.

Concentrazione diuron	Percentuale di fecondazione \pm ES	Percentuale di larve normomorfe \pm ES
Controllo	$98 \pm 1,2$	$88,27 \pm 1,3$
1 μ M	$98,5 \pm 1,9$	$87,67 \pm 1,5$
2 μ M	$97,4 \pm 1,5$	$87,25 \pm 1,4$
3 μ M	$97,6 \pm 1,6$	$88,42 \pm 1,7$
4 μ M	$98,2 \pm 1,2$	$89,42 \pm 1,6$
5 μ M	$97,8 \pm 1,7$	$88 \pm 1,8$
10 μ M	$98 \pm 1,3$	$87,5 \pm 2$

Tabella 6. Valori delle percentuali di fecondazione e di larve normomorfe ottenuti dalla fecondazione di ovociti incubati con differenti concentrazioni di diuron.

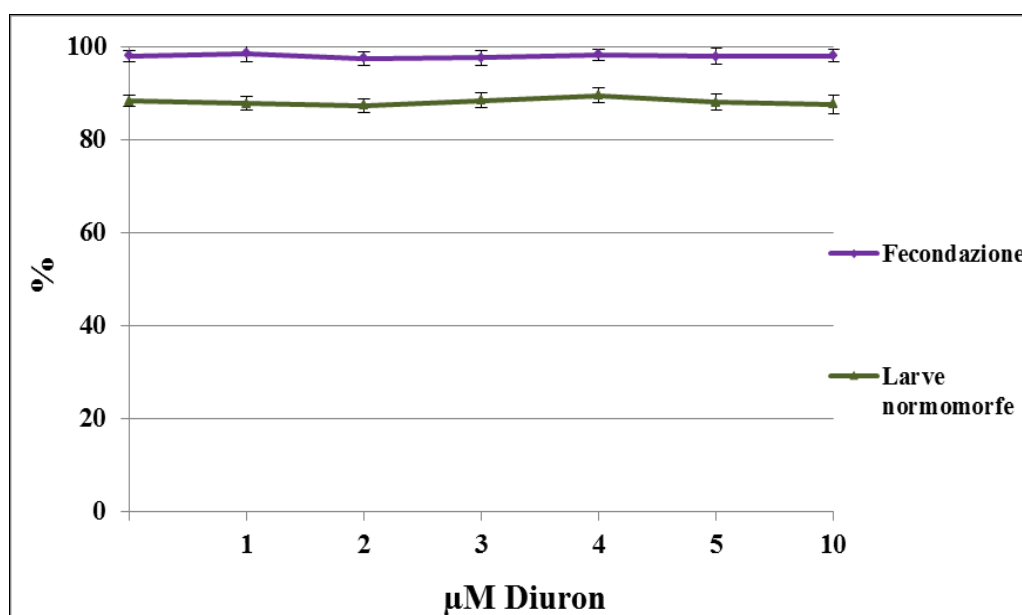


Figura 30. Percentuale di fecondazione e di larve normomorfe ottenute fecondando ovociti incubati in differenti concentrazioni di diuron e poi lavati.

4.5.3 Test di embriotossicità

Negli ovociti di controllo fecondati in AMNF, dopo 50 minuti dalla fecondazione, il $97,47 \pm 1,8 \%$ risulta fecondato. Per gli ovociti fecondati in AMNF contenete il TBT si osserva una progressiva e significativa riduzione della percentuale di fecondazione in modo dose-dipendente. Infatti in AMNF contenente TBT alla concentrazione di $1 \mu\text{M}$ il $80,35 \pm 3,8 \%$

($P < 0,01$) degli ovociti è fecondato, la percentuale diminuisce ulteriormente alla concentrazione di $2 \mu\text{M}$ ($31,25 \pm 3,6 \%$; $P < 0,01$) e raggiunge la massima diminuzione alla concentrazione di $3 \mu\text{M}$ ($9,17 \pm 2,6 \%$; $P < 0,01$), valore dopo il quale si raggiunge un fase di *plateau* ($5,43 \pm 2,2 \%$ in TBT $4 \mu\text{M}$; $7,61 \pm 2,5 \%$ in TBT $5 \mu\text{M}$ e $5,27 \pm 2 \%$ in TBT $10 \mu\text{M}$; $P < 0,01$). Dopo 24 ore dalla fecondazione nel controllo $83,29 \pm 2,5 \%$ degli embrioni da origine a larve natanti con normale morfologia. In presenza di TBT $1 \mu\text{M}$ si osserva una riduzione significativa rispetto al controllo della percentuale di larve natanti e normomorfe sviluppatesi dai suddetti embrioni ($34,35 \pm 3,1 \%$; $P < 0,01$). Alle altre concentrazioni di TBT testate, nonostante una bassa percentuale di ovociti risulti fecondata di questi però nessuno riesce a svilupparsi correttamente fino allo stadio larvale (Figura 31 e 32).

Diversamente dal TBT, la percentuale di fecondazione ottenuta da ovociti fecondati in AMNF contenente il diuron alle concentrazioni comprese tra 1 e $5 \mu\text{M}$ e di $10 \mu\text{M}$ risulta non significativamente differente (rispettivamente $97 \pm 1,4 \%$; $98,2 \pm 2,1$; $97,6 \pm 1,9 \%$; $98 \pm 1,8 \%$; $97,6 \pm 1,9$; $98,2 \pm 1,3 \%$) da quella ottenuta da ovociti di controllo fecondati in AMNF a cui non è stato aggiunto il diuron ($98,5 \pm 1 \%$). Inoltre la percentuale di larve natanti e normomorfe ottenuta da embrioni che si sono sviluppati da ovociti di controllo e quelli fecondati in AMNF contenente diuron alle concentrazioni comprese tra $1 \mu\text{M}$ e $5 \mu\text{M}$ (rispettivamente $89,1 \pm 1,4 \%$; $86,2 \pm 2,2$; $87 \pm 1,8 \%$; $86,5 \pm$

1,5 %; $85 \pm 1,9$; $85,1 \pm 1,7$ %) risultano non significativamente differenti tra loro. Gli embrioni che si sono sviluppati da ovociti fecondati in AMNF contenente diuron alla concentrazione di 10 μM danno origine a larve natanti e normomorfe in percentuale significativamente inferiore ($77,7 \pm 1,3$ %; $P < 0,01$) rispetto al controllo (Figura 33).

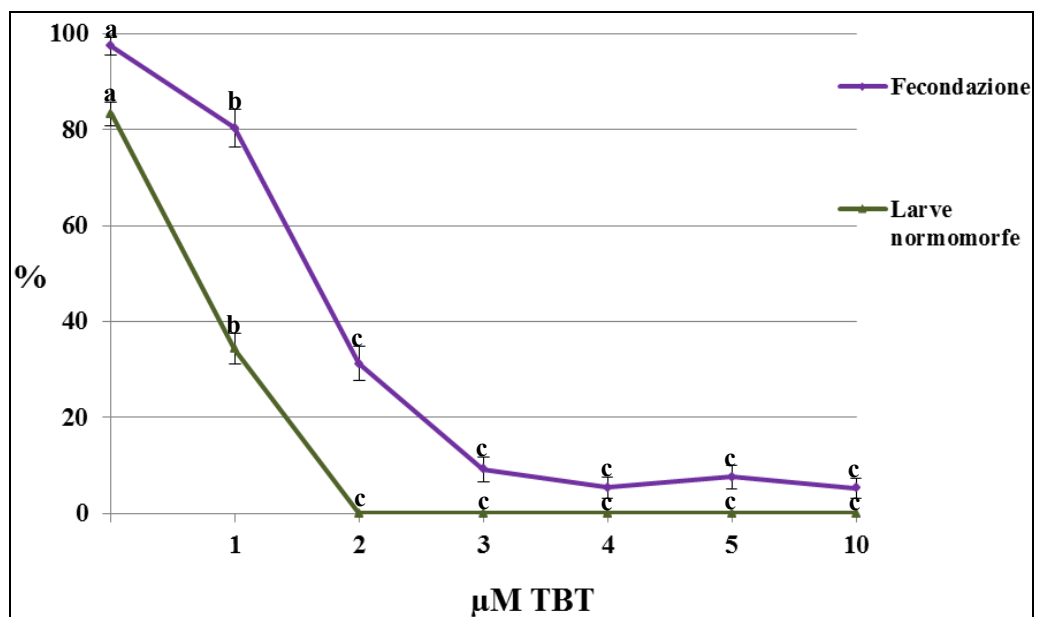


Figura 31. Percentuale di fecondazione e di larve natanti e normomorfe ottenute fecondando ovociti in AMNF e AMNF a cui è stato aggiunto TBT in differenti concentrazioni. a vs b vs c ($P < 0,01$).

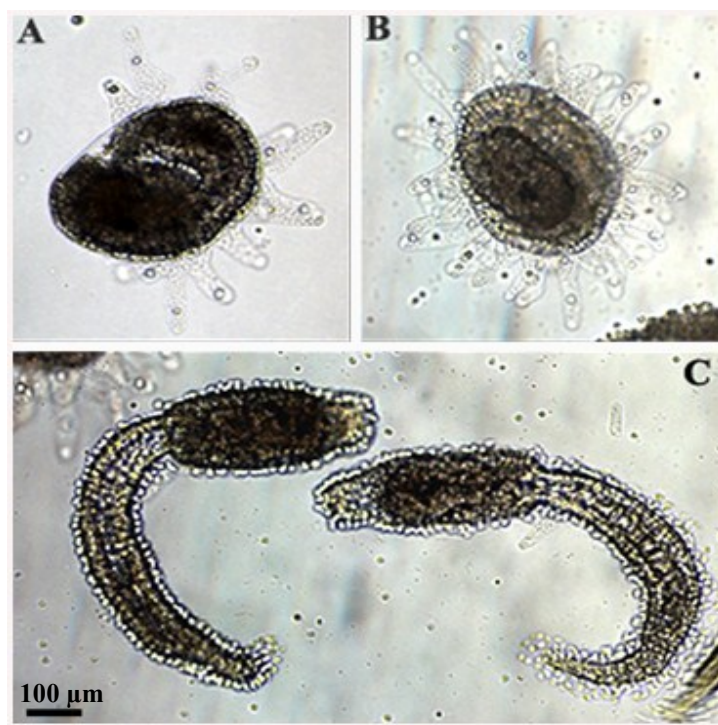


Figura 32. Embrioni arrestati a diversi stadi di sviluppo (A e B) e larve anomale (C) ottenute da ovociti fecondati in acqua di mare contenente TBT a concentrazione compresa tra 2 μM e 5 μM e di 10 μM .

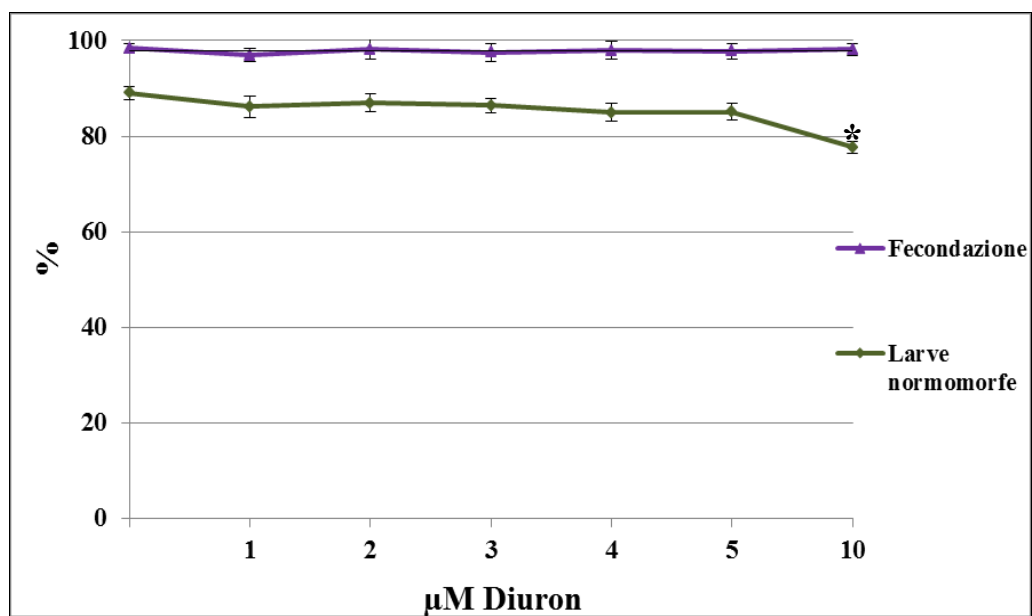


Figura 33. Percentuale di fecondazione e di larve natanti e normomorfe ottenute fecondando ovociti in AMNF e AMNF a cui è stato aggiunto diuron in differenti concentrazioni. L'asterisco (*) indica una variazione significativa rispetto al controllo ($P < 0,01$).

5. DISCUSSIONE

In questo lavoro di tesi abbiamo valutato e comparato gli effetti di due biocidi rilasciati dalle vernici antivegetative quali il TBT e il diuron sui processi riproduttivi e sullo sviluppo embrionale dell'invertebrato marino *Ciona intestinalis*.

Il TBT è stato ampiamente utilizzato come biocida nelle vernici antivegetative per un lungo periodo di tempo fino a quando, dimostrata la sua tossicità acuta e cronica, l'Organizzazione marittima internazionale ne proibì l'uso a partire dal 2008. Attualmente, nonostante il bando, l'interesse verso questo composto non si è attenuato in quanto, persistendo nell'ambiente acquatico, si è accumulato nei sedimenti che, a causa di correnti naturali o indotte da natanti, continuano a rilasciarlo gradualmente in acqua [28]. Il TBT a tutt'oggi è inoltre regolarmente utilizzato nei processi agricoli e industriali e nella formulazione delle vernici antivegetative in paesi che non aderiscono alla convenzione come il Brasile e l'Argentina [44].

Il bando del TBT ha determinato lo sviluppo di vernici antivegetative TBT-free che in alternativa utilizzano come componenti attivi i biocidi organici. Tuttavia le informazioni sulla tossicità di questi composti per gli organismi marini e le loro proprietà ambientali sono ancora scarse [84]. Il largo impiego di questi composti ha fatto sì che la loro concentrazione nell'ambiente marino aumentasse notevolmente rendendo necessari sempre più studi per la valutazione del rischio ambientale con particolare interesse per gli effetti nocivi che essi possono esercitare sulle popolazioni animali e vegetali.

In letteratura è ben nota l'influenza del TBT su diversi processi biologici relativi alla riproduzione quali la fecondazione, l'embriogenesi, lo sviluppo larvale e la metamorfosi in echinodermi, ascidie e crostacei [54,85-88], annoverando tra i meccanismi

responsabili dell'arresto larvale nelle ascidie il blocco dei microfilamenti e microtubuli costituenti il citoscheletro [89] e l'aumento delle attività enzimatiche [90].

Tra i meccanismi base della fecondazione e dello sviluppo sono di particolare importanza quelli riguardanti la membrana plasmatica. La membrana plasmatica è considerata la barriera tra l'ambiente intra- ed extra- cellulare, che regola gli scambi ionici tra questi due comparti ed è sede di ligandi, recettori e di canali ionici. Questa però è anche il più importante bersaglio degli inquinanti ambientali di natura lipofila. Infatti, l'assorbimento di questi inquinanti avviene principalmente nei tessuti idrofobici come appunto la membrana plasmatica [91] con conseguente alterazione della sua funzionalità [54].

Nonostante in letteratura sia evidente che il TBT eserciti un impatto negativo sulla membrana plasmatica il suo meccanismo molecolare d'azione non è stato del tutto chiarito.

In questo lavoro di tesi, con tecniche di elettrofisiologia, abbia valutato come le proprietà passive della membrana quale la conduttanza e quelle attive quali le correnti ioniche possano essere influenzate dal TBT e dal diuron riversate nell'ambiente marino dall'attività antropiche.

Infatti, in seguito all'incubazione sia in TBT che in diuron si osserva un incremento della conduttanza della membrana plasmatica e la riduzione in modo dose dipendente, a partire dalla concentrazione di 2 μ M, delle correnti di sodio che caratterizzano l'assetto elettrico dell'ovocito maturo dell'ascidia *Ciona intestinalis*.

In letteratura è riportato che la permeabilità della membrana plasmatica risulta modificata in seguito all'interazione con il TBT [92]. In particolare, negli ovociti di riccio di mare si è osservato che l'inserimento di questo biocida tra i fosfolipidi di membrana induce un aumento aspecifico della permeabilità membrana plasmatica [93].

La conduttanza della membrana plasmatica è direttamente proporzionale alla sua permeabilità quindi possiamo ipotizzare che anche negli ovociti maturi di *Ciona intestinalis* il TBT determi un incremento della permeabilità con conseguente aumento della conduttanza da noi registrato. In un precedente studio è stato dimostrato che il diuron può interagire con la membrana plasmatica perturbandola [94]; ciò porta a ipotizzare quindi che questo biocida agisca con un meccanismo di azione simile al TBT.

I risultati da noi ottenuti dimostrano inoltre un effetto dei due biocidi testati sui canali ionici di membrana. L'effetto inibitorio del TBT sui canali ionici voltaggio dipendenti è stato dimostrato precedentemente in ovociti di un'altra specie di ascidia la *Phallusia mammillata*. Da questo precedente studio è emerso che il TBT riduce le correnti ioniche di membrana in particolare correnti di sodio, potassio e calcio [80].

Per la prima volta invece in questo lavoro di tesi abbiamo dimostrato un effetto inibitorio del diuron sui canali ionici voltaggio dipendenti.

La riduzione delle correnti di sodio registrata dopo incubazione degli ovociti con entrambi i biocidi testati potrebbe essere determinata da un'alterazione della funzionalità dei canali di sodio voltaggio-dipendenti indotta dalla disorganizzazione strutturale della membrana plasmatica conseguente alla sua perturbazione dovuta al TBT. Tuttavia il potenziale di membrana, che riflette la sua integrità strutturale e funzionale, risulta inalterato in seguito all'incubazione con entrambi i biocidi (dato non mostrato) per cui possiamo escludere un'alterazione strutturale della membrana indotta da questi composti ed ipotizzare invece un loro effetto diretto sui canali ionici. Nel caso del TBT è stato ipotizzato che l'attrazione tra le sue cariche positive e quelle negative presenti sul poro d'ingresso del canale determini l'occlusione del poro da parte del TBT [80]. Un ugual meccanismo d'azione non è ipotizzabile per il diuron in quanto questo

composto non presenta cariche positive, è invece ipotizzabile che vada a competere con i siti di legame dei canali ionici.

Il TBT ma non il diuron ha un chiaro effetto anche sui canali di fecondazione. Dopo l'incubazione con il TBT, a tutte le concentrazioni testate, infatti la corrente di fecondazione presenta un'ampiezza ridotta. Il TBT quindi ha un effetto non solo sui canali di sodio voltaggio-dipendenti ma anche sui canali di fecondazione come già dimostrato nell'ascidia *Phallusia mammilata* [80]. I canali di fecondazione dell'ascidia *Ciona intestinalis* sono canali aspecifici ad alta conduttanza [73]. Questi tipi di canali hanno un poro di diametro maggiore rispetto ai canali ionici voltaggio-dipendente [95] questo potrebbe far sì che il TBT penetri in profondità nel canale bloccando il meccanismo di selettività allo ione. In alternativa è possibile ipotizzare che il TBT vada ad interferire con il *pathway* di trasduzione del segnale coinvolto nella genesi della corrente di fecondazione.

I test di spermiossicità condotti in questo lavoro di tesi hanno dimostrato che entrambi i biocidi testati non esercitano alcun effetto sugli spermatozoi. In particolare, poiché la percentuale di fecondazione ottenuta da ovociti fecondati con spermatozoi incubati con il TBT o il diuron non risulta variata, si può concludere che la capacità fecondante dello spermatozoo non ne è influenzata. Inoltre poiché anche la percentuale di larve normomorfe risulta inalterata dopo il trattamento con TBT e diuron si può affermare che entrambi questi biocidi non esercitano alcun danno sugli spermatozoi che possa dare origine a malformazioni della progenie. In spermatozoi di altre ascidie è stato invece osservato che il TBT induce danni strutturali quali degenerazione del nucleo, tuttavia in questo studio, diversamente dai nostri protocolli, il tempo di incubazione è maggiore (3 ore) [87]. In spermatozoi di pesce gatto invece il TBT induce una riduzione della motilità e del metabolismo cellulare [96]. Nel riccio di mare, l'incubazione in diuron

degli spermatozoi determina una riduzione della loro capacità fecondante e danni permanenti trasmessi alla progenie anche se in questo caso sono state testate concentrazioni maggiori di diuron [66,97]. In spermatozoi di ostriche è stato invece dimostrato che il diuron induce genotossicità ma non citossicità a basse concentrazioni, tuttavia l'impatto di questa genotossicità sulla progenie non è stato approfondito [65].

I saggi di tossicità sugli ovociti condotti in questo lavoro di tesi hanno inoltre dimostrato che il pre-trattamento con TBT e con diuron non influisce sulla fecondazione e sullo sviluppo embrionale. In un'altra specie di ascidia studi di microscopia hanno evidenziato che il TBT, dopo tre ore di incubazione, causa modificazioni ultrastrutturali delle cellule testali e del citoplasma corticale e danni ai mitocondri, inoltre questi ovociti se fecondati non subiscano la prima divisione cellulare [87]. Nel riccio di mare ovociti pre-incubati in TBT, a concentrazioni nanomolari, e poi fecondati mostrano un ritardo nelle divisioni cellulari, che aumenta all'aumentare del tempo di incubazione, determinato da un'alterazione del processo di sintesi delle macromolecole [54]. Per il diuron invece non sono riportati in letteratura precedenti studi di tossicità sugli ovociti.

Tra i saggi di tossicità condotti in questo lavoro di tesi, quello di embriotossicità risulta il più sensibile. Quando gli ovociti sono fecondati in acqua di mare contenente TBT la percentuale di fecondazione si riduce progressivamente e in modo dose dipendente, a partire dalla più bassa concentrazione testata di 1 μM , fino a raggiungere la massima riduzione a partire dalla concentrazione di 3 μM dopo la quale si raggiunge una fase di *plateau*. Poiché gli esperimenti di elettrofisiologia hanno dimostrato una riduzione della percentuale di ovociti generanti la corrente di fecondazione possiamo sostenere che il TBT inibisce la fecondazione in ovociti di *Ciona intestinalis*. Poiché abbiamo dimostrato che il TBT non altera la capacità fecondante dello spermatozoo nè esercita alcun effetto sugli ovociti pre-trattati con esso, possiamo ipotizzare che il TBT inibisca

la fecondazione andando ad interagire con il processo di interazione ovocita-spermatozoo. Nelle ascidie la fecondazione consta di una prima interazione tra ovocita e spermatozoo a livello del corion. Lo spermatozoo infatti riconosce e lega glicosidasi presenti sul corion dopodiché lo attraversa, migra nello spazio perivitellino e raggiunge la membrana plasmatica ovocitaria a livello della quale si verifica la seconda interazione che determina la fusione del materiale genetico e l'attivazione ovocitaria. I risulta da noi ottenuti dagli esperimenti di elettrofisiologia e dai saggi di embriotossicità dimostrano rispettivamente che il TBT inibisce la fecondazione in ovociti con e senza corion, facendo quindi ipotizzare che esso ostacoli la seconda interazione tra ovocita e spermatozoo impedendone quindi la fusione, in accordo con quanto osservato in altre specie di ascidie i cui ovociti fecondati in TBT presentavano alterazioni strutturali delle cellule testali e del citoplasma corticale e non si dividevano [87,98]. Nell'ascidia *Phallusia mammillata* invece è stato dimostrato che il TBT inibisce l'interazione ovocita spermatozoo a livello del corion [80].

Da questo lavoro di tesi emerge che il TBT esercita la sua tossicità non solo a livello della membrana plasmatica ma anche a livello cellulare; è ben noto infatti che questo biocida può facilmente attraversare la membrana plasmatica e raggiungere l'ambiente intracellulare esercitando anche qui la sua tossicità con differenti meccanismi d'azione [99].

I risultati da noi ottenuti mostrano che la bassa percentuale di ovociti fecondati in acqua di mare contenente TBT e lasciati sviluppare in essa non riesce a completare lo sviluppo embrionale e raggiungere quindi lo stadio larvale, in accordo con i risultati ottenuti da precedenti studi condotti sia sulla *Ciona* che su altre specie di ascidie a concentrazioni simili [86,100,101] e inferiori di composto [88]. A differenza dei nostri protocolli, in questi studi gli ovociti venivano fecondati in acqua di mare priva di TBT e poi a

differenti stadi di sviluppo trasferiti e lasciati sviluppare in acqua di mare contenente il biocida.

Sono stati proposti differenti meccanismi mediante i quali il TBT blocca lo sviluppo embrionale. Studi ultrastrutturali hanno dimostrato che una possibile causa dell'arresto dello sviluppo embrionale è l'inibizione della polimerizzazione dei microtubuli e del fuso mitotico [56,89] determinata dalla diretta interazione del TBT con la tubulina [31]. E' ben noto che il TBT può interagire con proteine cellulari inducendone cambiamenti conformazionali con conseguente alterazione della loro attività [56]. Nei precedenti studi, gli embrioni esposti al TBT a un determinato stadio di sviluppo si arrestano [56,89]. Nel nostro caso invece, gli ovociti se fecondati sono capaci di dividersi anche se il successivo sviluppo risulta anomalo. I meccanismi mediante il quale il TBT altera lo sviluppo embrionale nell'ascidia *Ciona intestinalis* possono essere differenti.

Gli esperimenti di elettrofisiologia da noi condotti in questo lavoro hanno evidenziato un chiaro effetto del TBT sulla corrente di fecondazione. In letteratura sono riportati differenti studi in cui si ipotizza che questa corrente abbia un ruolo nel corretto sviluppo embrionale [20,21]. I risultati ottenuti da questo lavoro supportano quest'ipotesi in quanto la riduzione dell'ampiezza della corrente di fecondazione generata da ovociti pre-incubati in TBT si ripercuote sul successivo sviluppo embrionale.

Gli ovociti maturi delle ascidie sono caratterizzati dalla presenza di determinanti citoplasmatici che regolano il corretto sviluppo embrionale. Con la fecondazione si assiste ad una ridistribuzione di questi determinanti in differenti blastomeri che ne specificano il futuro destino cellulare. Gli elementi citoscheletrici giocano un ruolo fondamentale nella corretta distribuzione di questi determinanti alla fecondazione. La loro alterazione può quindi indurre una localizzazione errata dei determinanti con conseguente anomalie nel successivo sviluppo embrionale. Nel nostro caso quindi si

può ipotizzare che il TBT alterando gli elementi citoscheletrici determini una non corretta localizzazione dei determinanti citoplasmatici che possono essere causa delle anomalie nello sviluppo da noi osservate.

I mitocondri svolgono un ruolo fondamentale nello sviluppo embrionale delle ascidie modulando i segnali di calcio e producendo ATP, metaboliti intermedi e specie reattive dell'ossigeno. Disfunzioni mitocondriali possono quindi compromettere lo sviluppo embrionale [102]. In letteratura è ampiamente riportato che il TBT danneggia i mitocondri inibendo la fosforilazione ossidativa o l'idrolisi dell' ATP [103]. Le anomalie nello sviluppo embrionale dell'ascidia *Ciona intestinalis* da noi osservate possono essere dovute ad un' azione tossica del TBT sui mitocondri.

Diversamente dal TBT, il diuron, a tutte le concentrazioni testate in questo lavoro, non ha alcun effetto sui meccanismi di fecondazione. Inoltre alle concentrazioni comprese tra 1 μM e 5 μM non influenza lo sviluppo embrionale che risulta invece alterato alla concentrazione di 10 μM . I risultati da noi ottenuti sono in accordo con quelli riportati in letteratura. Infatti differenti studi condotti su specie diverse hanno evidenziato che sono necessarie concentrazioni elevate di diuron per osservare un suo effetto sullo sviluppo embrionale [66,67,104].

La sensibilità dell'ascidia *Ciona intestinalis* al TBT e al diuron indica che la concentrazione necessaria affinché si abbia un effetto tossico è più alta di quelle rilevate nell'ambiente marino [47,105,106], entrambi i biocidi quindi non rappresentano per ora una minaccia per questa specie di ascidia. Questo però non significa escludere un eventuale rischio futuro in quanto dobbiamo considerare sia l'accumulo a cui sono sottoposti questi composti sia l'effetto sinergico con altri biocidi che può avere un impatto negativo maggiore rispetto a quello del singolo biocida.

6. CONCLUSIONI

Nell'ambito del monitoraggio ambientale, negli ultimi anni si è andato affermando il biomonitoraggio che stima gli effetti biologici degli xenobiotici mediante organismi viventi e parametri biologici. Il biomonitoraggio si avvale dell'uso di bioindicatori, ossia di organismi che mediante reazioni identificabili (biochimiche, fisiologiche, morfologiche, ecc.) forniscono informazioni sulla qualità dell'ambiente o di una parte di esso. In questi organismi vengono identificati i *biomarkers* cioè variazioni biochimiche, cellulari, fisiologiche o comportamentali indotte dal contaminante facilmente misurabili e che forniscono l'evidenza di un'esposizione e/o un effetto ad uno o più composti inquinanti [107]. L'ecotossicologia ha come obiettivo la valutazione dell'esposizione e dell'effetto dei composti inquinanti sulle popolazioni e/o comunità naturali. Per far ciò essa si avvale dell'utilizzo dei *biomarkers* in quanto permettono di stimare il tipo di contaminante a cui l'organismo bioindicatore è esposto ed i livelli semi-quantitativi di esposizione ma anche di prevedere il verificarsi di effetti negativi a lungo termine anche su scala ecologica.

In questo lavoro di tesi abbiamo dimostrato che il diuron esercita sui gameti, sulla fecondazione e sullo sviluppo embrionale dell'ascidia *Ciona intestinalis* un'azione meno tossica rispetto al TBT. Da questo lavoro emerge inoltre che la sensibilità di questa ascidia ai biocidi testati è comparabile a quella di altri invertebrati marini. Per tale motivo quindi questa specie può essere considerata un buon organismo modello da utilizzare per testare la tossicità degli xenobiotici. Una caratteristica infatti di un buon organismo modello è che le conoscenze da esso ottenute possano essere trasferibili, in misura più o meno ampia, ad altri organismi.

Abbiamo infine dimostrato che i meccanismi riproduttivi risultano fortemente influenzati dalla presenza di xenobiotici in ambiente marino. La riproduzione può essere quindi considerata un buon *biomarker* indicatore del livello di rischio tossicologico a cui una determinata popolazione naturale può essere sottoposta.

7. BIBLIOGRAFIA

1. Tosti E, Boni R (2011) *Oocyte maturation and fertilization: a long history for a short event*. Dubai: Bentham Science Publishers.
2. Tosti E, Dale B (1995) *Fecondazione in vitro*. Italia: Edizioni scientifiche italiane.
3. Yanagimachi R (1994) *Mammalian Fertilization*. In: J KEN, editor. The Physiology of Reproduction. New York: Raven press.
4. Tosti E, Boni R (2004) *Electrical events during gamete maturation and fertilization in animals and humans*. Human Reproduction Update (10): 53-65.
5. DeFelice LJ (1997) *Electrical properties of cells*. New York: Plenum Press.
6. Hagiwara S, Jaffe LA (1979) *Electrical properties of egg cell membranes*. Annual Review of Biophysics & Bioengineering (8): 385-416.
7. Takahashi K, Okamura Y (1998) *Ion channels and early development of neural cells*. Physiological Reviews (78): 307-337.
8. Dale B, Wilding M (2011) *Ionic events at fertilization*. In: Tosti E, Boni R, editors. Oocyte maturation and fertilization: A long history for a short event. Dubai: Bentham Science Publisher. pp. 104-120.
9. Okamoto H, Takahashi K, Yamashita N (1977) *Ionic currents through the membrane of the mammalian oocyte and their comparison with those in the tunicate and sea urchin*. The Journal of Physiology (267): 465-495.
10. Schlichter LC (1989) *Ionic currents underlying the action potential of Rana pipiens oocytes*. Developmental Biology (134): 59-71.

11. Block ML, Moody WJ (1987) *Changes in sodium, calcium and potassium currents during early embryonic development of the ascidian Boltenia villosa*. The Journal of Physiology (393): 619-634.
12. Dale B (1994) *Oocyte activation in invertebrates and humans*. Zygote (2): 373-377.
13. Dube F (1988) *The relationships between early ionic events, the pattern of protein synthesis, and oocyte activation in the surf clam, Spisula solidissima*. Developmental Biology (126): 233-241.
14. Goudeau H, Depresle Y, Rosa A, Goudeau M (1994) *Evidence by a voltage clamp study of an electrically mediated block to polyspermy in the egg of the ascidian Phallusia mammillata*. Developmental Biology (166): 489-501.
15. Jaffe LA, Cross NL (1986) *Electrical regulation of sperm-egg fusion*. Annual Review of Physiology (48): 191-200.
16. De Simone ML, Grumetto L, Tosti E, Wilding M, Dale B (1998) *Non-specific currents at fertilisation in sea urchin oocytes*. Zygote (6): 11-15.
17. Gianaroli L, Tosti E, Magli C, Iaccarino M, Ferraretti AP, Dale B (1994) *Fertilization current in the human oocyte*. Molecular Reproduction and Development (38): 209-214.
18. Glahn D, Nuccitelli R (2003) *Voltage-clamp study of the activation currents and fast block to polyspermy in the egg of Xenopus laevis*. Development, Growth & Differentiation (45): 187-197.
19. Tosti E, Boni R, Cuomo A (2002) *Fertilization and activation currents in bovine oocytes*. Reproduction (124): 835-846.
20. Cuomo A, Silvestre F, De Santis R, Tosti E (2006) *Ca²⁺ and Na⁺ current patterns during oocyte maturation, fertilization, and early developmental stages of Ciona intestinalis*. Molecular Reproduction and Development (73): 501-511.

21. Tosti E, Romano G, Buttino I, Cuomo A, Ianora A, Miralto A (2003) ***Bioactive aldehydes from diatoms block the fertilization current in ascidian oocytes***. Molecular Reproduction and Development (66): 72-80.
22. Au DW, Lee CY, Chan KL, Wu RS (2001) ***Reproductive impairment of sea urchins upon chronic exposure to cadmium. Part I: Effects on gamete quality***. Environmental Pollution (111): 1-9.
23. Arukwe A, Goksøyr A (1998) ***Xenobiotics, xenoestrogens and reproduction disturbances in fish***. Sarsia (83): 225-241.
24. Lewis J (1998) ***Marine biofouling and its prevention on underwater surfaces***. Materials Forum (22): 41-61.
25. Scheer BT (1945) ***The development of marine fouling communities***. The Biological Bulletin (89): 103-121.
26. Terlizzi A, Fraschetti S, Gianguzza P, Faimali M, Boero F (2001) ***Environmental impact of antifouling technologies: state of the art and perspectives***. Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems (11): 311-317.
27. Readman J (2006) ***Development, Occurrence and Regulation of Antifouling Paint Biocides: Historical Review and Future Trends***. In: Konstantinou I, editor. Antifouling Paint Biocides. Germany: Springer Berlin Heidelberg. pp. 1-15.
28. Dafforn KA, Lewis JA, Johnston EL (2011) ***Antifouling strategies: history and regulation, ecological impacts and mitigation***. Marine Pollution Bulletin (62): 453-465.
29. Huggett RJ, Unger MA, Seligman PF, Valkirs AO (1992) ***The marine biocide tributyltin. Assessing and managing the environmental risks***. Environmental Science & Technology (26): 232-237.

30. Antizar-Ladislao B (2008) *Environmental levels, toxicity and human exposure to tributyltin (TBT)-contaminated marine environment*. Environment International (34): 292-308.
31. Pellerito C, Nagy L, Pellerito L, Szorcsik A (2006) *Biological activity studies on organotin(IV)ⁿ⁺ complexes and parent compounds*. The Journal of Organometallic Chemistry (691): 1733-1747.
32. Hoch M (2001) *Organotin compounds in the environment - an overview*. Applied Geochemistry (16): 719-743.
33. Omae I (2003) *Organotin antifouling paints and their alternatives*. Applied Organometallic Chemistry (17): 81-105.
34. Fent K (2006) *Worldwide occurrence of organotins from antifouling paints and effects in the aquatic environment*. The Handbook of Environmental Chemistry (5): 71-100.
35. Fent K (1996) *Ecotoxicology of organotin compounds*. Critical Reviews in Toxicology (26): 1-117.
36. Tobias RS (1978) *The chemistry of organometallic cations in aqueous media*. In: Brinkman T, Bellema L, editors. Organometals and Organometalloids: Occurrence and Fate in the Environment. Washington American Chemical Society. pp. 130-148.
37. Arnold CG, Weidenhaupt A, David MM, Müller SR, Haderlein SB, Schwarzenbach RP (1997) *Aqueous Speciation and 1-Octanol–Water Partitioning of Tributyl- and Triphenyltin: Effect of pH and Ion Composition*. Environmental Science & Technology (31): 2596-2602.
38. Hoch M, Alonso-Azcarate J, Lischick M (2002) *Adsorption behavior of toxic tributyltin to clay-rich sediments under various environmental conditions*. Environmental Toxicology & Chemistry (21): 1390-1397.

39. Langston WJ, Pope ND (1995) ***Determinants of TBT adsorption and desorption in estuarine sediments***. Marine Pollution Bulletin (31): 32-43.
40. Ceulemans M, Slaets S, Adams F (1998) ***Speciation of organotin in environmental sediment samples***. Talanta (46): 395-405.
41. Dowson PH, Bubbs JM, Lester JN (1996) ***Persistence and degradation pathways of tributyltin in freshwater and estuarine sediments***. Estuarine, Coastal and Shelf Science (42): 551-562.
42. Dubey SK, Roy U (2003) ***Biodegradation of tributyltins (organotins) by marine bacteria***. Applied Organometallic Chemistry (17): 3-8.
43. Goldberg ED (1986) ***TBT: an environmental dilemma***. Environment: Science and Policy for Sustainable Development (28): 17-44.
44. Graceli JB, Sena GC, Lopes PFI, Zamprogno GC, da Costa MB, Godoi AFL, dos Santos DM, de Marchi MRM, dos Santos Fernandez MA (2013) ***Organotins: A review of their reproductive toxicity, biochemistry, and environmental fate***. Reproductive Toxicology (36): 40-52.
45. Alzieu CL, Sanjuan J, Deltreil JP, Borel M (1986) ***Tin contamination in Arcachon Bay: effects on oyster shell anomalies***. Marine Pollution Bulletin (17): 494-498.
46. Smith BS (1981) ***Tributyltin compounds induce male characteristics on female mud snails Nassarius obsoletus = Ilyanassa obsoleta***. Journal of Applied Toxicology (1): 141-144.
47. Alzieu C (2000) ***Environmental impact of TBT: the French experience***. Science of the Total Environment (258): 99-102.
48. Spooner N, Gibbs PE, Bryan GW, Goad LJ (1991) ***The effect of tributyltin upon steroid titres in the female dogwhelk, Nucella lapillus, and the development of imposex***. Marine Environmental Research (32): 37-49.

49. Garaventa F, Centanni E, Pellizzato F, Faimali M, Terlizzi A, Pavoni B (2007) ***Imposex and accumulation of organotin compounds in populations of Hexaplex trunculus (Gastropoda, Muricidae) from the Lagoon of Venice (Italy) and Istrian Coast (Croatia)***. Marine Pollution Bulletin (54): 615-622.
50. Gibbs PE, Pascoe PL, Bryan GW (1991) ***Tributyltin-induced imposex in stenoglossan gastropods: pathological effects on the female reproductive system***. Comparative Biochemistry and Physiology Part C (100): 231-235.
51. Bouchard N, Pelletier E, Fournier M (1999) ***Effects of butyltin compounds on phagocytic activity of hemocytes from three marine bivalves***. Environmental Toxicology & Chemistry (18): 519-522.
52. Cima F, Marin MG, Matozzo V, Ros LD, Ballarin L (1999) ***Biomarkers for TBT Immunotoxicity Studies on the Cultivated Clam Tapes philippinarum (Adams and Reeve, 1850)***. Marine Pollution Bulletin (39): 112-115.
53. Nishikimi A, Kira Y, Kasahara E, Sato EF, Kanno T, Utsumi K, Inoue M (2001) ***Tributyltin interacts with mitochondria and induces cytochrome c release***. Biochemical Journal (356): 621-626.
54. Girard JP, Szpunar J, Pedrotti ML, Pesando D (2000) ***Toxicity of tri-n-butyltin to sea urchin eggs and larvae: Relation to bioaccumulation at the nanomolar level***. Environmental Toxicology & Chemistry (19): 1272-1277.
55. Petrosyan VS, Gracheva YA, Tyurin VY, Grigor'ev EV, Milaeva ER, Pellerito L (2003) ***Effect of Organotin Compounds and Their Complexes with Phosphatidylcholine on Peroxide Oxidation of Lipid Structural Fragments***. Russian Journal of Organic Chemistry (39): 353-356.
56. Cima F, Ballarin L, Bressa G, Martinucci G, Burighel P (1996) ***Toxicity of organotin compounds on embryos of a marine invertebrate (Styela plicata; tunicata)***. Ecotoxicology and Environmental Safety (35): 174-182.

57. Ortiz A, Teruel JA, Aranda FJ (2005) ***Effect of triorganotin compounds on membrane permeability***. Biochimica et Biophysica Acta (1720): 137-142.
58. Yallapragada PR, Vig PJ, Desai D (1990) ***Differential effects of triorganotins on calmodulin activity***. Journal of Toxicology and Environmental Health (29): 317-327.
59. Osada S, Nishikawa J, Nakanishi T, Tanaka K, Nishihara T (2005) ***Some organotin compounds enhance histone acetyltransferase activity***. Toxicology Letters (155): 329-335.
60. Chesworth JC, Donkin ME, Brown MT (2003) ***The interactive effects of the antifouling herbicides Irgarol 1051 and Diuron on the seagrass Zostera marina (L.)***. Aquatic Toxicology (66): 293-305.
61. Giacomazzi S, Cochet N (2004) ***Environmental impact of diuron transformation: a review***. Chemosphere (56): 1021-1032.
62. Okamura H (2002) ***Photodegradation of the antifouling compounds Irgarol 1051 and Diuron released from a commercial antifouling paint***. Chemosphere (48): 43-50.
63. van Hattum B, Baart A, Boon J (2006) ***Emission Estimation and Chemical Fate Modelling of Antifoulants***. In: Konstantinou I, editor. Antifouling Paint Biocides. Germany: Springer Berlin Heidelberg. pp. 101-120.
64. Gagnon MM, Rawson CA (2009) ***Diuron increases spinal deformity in early-life-stage pink snapper Pagrus auratus***. Marine Pollution Bulletin (58): 1083-1085.
65. Akcha F, Spagnol C, Rouxel J (2012) ***Genotoxicity of diuron and glyphosate in oyster spermatozoa and embryos***. Aquatic Toxicology (106-107): 104-113.
66. Manzo S, Buono S, Cremisini C (2006) ***Toxic Effects of Irgarol and Diuron on Sea Urchin Paracentrotus lividus Early Development, Fertilization, and Offspring Quality***. Archives of Environmental Contamination and Toxicology (51): 61-68.

67. Perina F, Souza Abessa D, Pinho G, Fillmann G (2011) ***Comparative toxicity of antifouling compounds on the development of sea urchin***. *Ecotoxicology* (20): 1870-1880.
68. Voulvoulis N (2006) ***Antifouling Paint Booster Biocides: Occurrence and Partitioning in Water and Sediments***. In: Konstantinou I, editor. *Antifouling Paint Biocides*. Germany: Springer Berlin Heidelberg. pp. 155-170.
69. Bellas J, Vázquez E, Beiras R (2001) ***Toxicity of Hg, Cu, Cd, and Cr on early developmental stages of Ciona intestinalis (Chordata, Ascidiacea) with potential application in marine water quality assessment***. *Water Research* (35): 2905-2912.
70. Zega G, Pennati R, Candiani S, Pestarino M, De Bernardi F (2009) ***Solitary ascidians embryos (Chordata, Tunicata) as model organisms for testing coastal pollutant toxicity***. *Invertebrate Survival Journal* (6): S29-S34.
71. Satoh N (1994) ***Developmental biology of ascidian***. Cambridge: Cambridge University Press.
72. Tosti E, Gallo A, Silvestre F (2011) ***Ion currents involved in oocyte maturation, fertilization and early developmental stages of the ascidian Ciona intestinalis***. *Molecular Reproduction and Development* (78): 854-860.
73. Dale B, De Felice L (1984) ***Sperm-activated channels in ascidian oocytes***. *Developmental Biology* (101): 235-239.
74. Dale B, Wilding M, Coppola G, Tosti E (2010) ***How do spermatozoa activate oocytes?*** *Reproductive BioMedicine Online* (21): 1-3.
75. Brownlee C, Dale B (1990) ***Temporal and spatial correlation of fertilization current, calcium waves and cytoplasmic contraction in eggs of Ciona intestinalis***. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* (239): 321-328.

76. Abrieu A, Doree M, Fisher D (2001) *The interplay between cyclin-B-Cdc2 kinase (MPF) and MAP kinase during maturation of oocytes*. Journal of Cell Science (114): 257-267.
77. Russo GL, Kyoizuka K, Antonazzo L, Tosti E, Dale B (1996) *Maturation promoting factor in ascidian oocytes is regulated by different intracellular signals at meiosis I and II*. Development (122): 1995-2003.
78. Dehal P, Satou Y, Campbell RK, Chapman J, Degnan B, De Tomaso A, Davidson B, Di Gregorio A, Gelpke M, Goodstein DM (2002) *The draft genome of Ciona intestinalis: insights into chordate and vertebrate origins*. Science (298): 2157-2167.
79. Russo GL, Bilotto S, Ciarcia G, Tosti E (2009) *Phylogenetic conservation of cytostatic factor related genes in the ascidian Ciona intestinalis*. Gene (429): 104-111.
80. Franchet C, Goudeau M, Goudeau H (1998) *Tributyltin impedes early sperm-egg interactions at the egg coat level in the ascidian Phallusia mammillata but does not prevent sperm-egg fusion in naked eggs*. Aquatic Toxicology (44): 213-228.
81. Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B, Sigworth F (1981) *Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches*. Pflügers Archiv: European Journal of Physiology (391): 85-100.
82. Sakmann B, Neher E (1984) *Patch clamp techniques for studying ionic channels in excitable membranes*. Annual Review of Physiology (46): 455-472.
83. Ogden D, Stanfield P (1994) *Patch clamp techniques for single channel and whole-cell recording*. In: Ogden D, editor. Microelectrode techniques: the Plymouth workshop handbook. Cambridge: The Company of Biologists Ltd.
84. Yebra DM, Kiil S, Dam-Johansen K (2004) *Antifouling technology—past, present and future steps towards efficient and environmentally friendly antifouling coatings*. Progress in Organic Coatings (50): 75-104.

85. Patricolo E, Mansueto C, D'Agati P, Pellerito L (2001) ***Organometallic complexes with biological molecules: XVI. Endocrine disruption effects of tributyltin (IV) chloride on metamorphosis of the ascidian larva***. Applied Organometallic Chemistry (15): 916-923.
86. Pellerito L, Gianguzza M, Dolcemascolo G, Mansueto C (1996) ***Effects of tributyltin (IV) chloride exposure on larvae of Ciona intestinalis (Urochordata): an ultrastructural study***. Applied Organometallic Chemistry (10): 405-413.
87. Villa L, Agati P, Mansueto C, Pellerito C, Scopelliti M, Fiore T, Nagy L, Pellerito L (2003) ***Effects of tributyltin (IV) chloride on the gametes and fertilization of Ascidia malaca (Ascidacea: Tunicata)***. Applied Organometallic Chemistry (17): 106-112.
88. Bellas J, Beiras R, Marino-Balsa JC, Fernandez N (2005) ***Toxicity of organic compounds to marine invertebrate embryos and larvae: a comparison between the sea urchin embryogenesis bioassay and alternative test species***. Ecotoxicology (14): 337-353.
89. Dolcemascolo G, Gianguzza P, Pellerito C, Pellerito L, Gianguzza M (2005) ***Effects of tri-n-butyltin (IV) chloride on neurulation of Ciona intestinalis (Tunicata, Ascidacea): an ultrastructural study***. Applied Organometallic Chemistry (19): 11-22.
90. Cangialosi MV, Mansueto V, Puccia E, Corsi I, Bonacci S, Focardi S, Mazzola A (2009) ***A biochemical study of the effects of tributyltin on unfertilized eggs, embryos and larvae of the sea squirt Ciona intestinalis***. Caryologia (62): 309-315.
91. Escher BI, Schwarzenbach RP (2002) ***Mechanistic studies on baseline toxicity and uncoupling of organic compounds as a basis for modeling effective membrane concentrations in aquatic organisms***. Aquatic Sciences (64): 20-35.
92. Mansueto C, Pellerito L, Girasolo M (1989) ***Organometallic complexes in Ascidian embryonic development. I, Effects on gametes and fertilization***. Acta Embryologiae et Morphologiae Experimentalis (10): 237-258.

93. Girard J-P, Ferrua C, Pesando D (1997) *Effects of tributyltin on Ca²⁺ homeostasis and mechanisms controlling cell cycling in sea urchin eggs*. Aquatic Toxicology (38): 225-239.
94. Mech A, Orynbayeva Z, Irgebayev K, Kolusheva S, Jelinek R (2008) *Screening membrane interactions of pesticides by cells decorated with chromatic polymer nanopatches*. Chemical Research in Toxicology (22): 90-96.
95. Hille B (2001) *Ion Channels of Excitable Membranes*. Sunderland MA: Sinauer Associates.
96. Rurangwa E, Biegniowska A, Slominska E, Skorkowski E, Ollevier F (2002) *Effect of tributyltin on adenylate content and enzyme activities of teleost sperm: a biochemical approach to study the mechanisms of toxicant reduced spermatozoa motility*. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology (131): 335-344.
97. Arizza V, Di Fazio G, Celi M, Parrinello N, Vazzana M (2010) *Cadmium, Copper and Tributyltin effects on fertilization of Paracentrotus lividus (Echinodermata)*. Italian Journal of Animal Science (8): 839-841.
98. Mansueto C, Villa L, D'Agati P, Marcianò V, Pellerito C, Fiore T, Scopelliti M, Nagy L, Pellerito L (2003) *Effects of tributyltin (IV) chloride on fertilization of Styela plicata (Ascidacea: Tunicata): II. Scanning and transmission electron microscopy studies*. Applied Organometallic Chemistry (17): 553-560.
99. Gray BH, Porvaznik M, Flemming C, Lee LH (1987) *Tri-n-Butyltin: a membrane toxicant*. Toxicology (47): 35-54.
100. Mansueto C, Gianguzza M, Dolcemascolo G, Pellerito L (1993) *Effects of tributyltin (IV) chloride exposure on early embryonic stages of Ciona intestinalis: in vivo and ultrastructural investigations*. Applied Organometallic Chemistry (7): 391-399.

101. Mansueto C, Valvo ML, Pellerito L, Girasolo MA (1993) ***Organometallic complexes in ascidian embryonic development: II. Effects on different stages and larvae.*** Applied Organometallic Chemistry (7): 95-107.
102. Dumollard R, Duchen M, Carroll J (2007) ***The role of mitochondrial function in the oocyte and embryo.*** Current Topics in Developmental Biology (77): 21-49.
103. Corsini E, Viviani B, Marinovich M, Galli CL (1997) ***Role of mitochondria and calcium ions in tributyltin-induced gene regulatory pathways.*** Toxicology and Applied Pharmacology (145): 74-81.
104. DeLorenzo ME, Fulton MH (2012) ***Comparative risk assessment of permethrin, chlorothalonil, and diuron to coastal aquatic species.*** Marine Pollution Bulletin (64): 1291-1299.
105. Konstantinou IK, Albanis TA (2004) ***Worldwide occurrence and effects of antifouling paint booster biocides in the aquatic environment: a review.*** Environment International (30): 235-248.
106. Manzo S, Buono S, Cremisini C (2008) ***Predictability of copper, irgarol, and diuron combined effects on sea urchin Paracentrotus lividus.*** Archives of Environmental Contamination and Toxicology (54): 57-68.
107. Depledge M, Fossi M (1994) ***The role of biomarkers in environmental assessment (2). Invertebrates.*** Ecotoxicology (3): 161-172.